

Die dreidimensionale Struktur des Influenzavirus-Hämagglutinin im membranfusionsaktiven Zustand

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biophysik

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biophysiker Kai Ludwig
geb. am 26. März 1966 in Zittau

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Dr. h. c. Hans Meyer

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Jürgen P. Rabe

Gutachter:

1. Prof. Dr. A. Herrmann
2. Prof. Dr. M. F. G. Schmidt
3. Prof. Dr. K. Arnold

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Juni 2000

Bibliografische Beschreibung und Referat

Die dreidimensionale Struktur des Influenzavirus-Hämagglutinin im membranfusionsaktiven Zustand

139 Seiten, 46 Abbildungen und 2 Tabellen

Kai Ludwig, 2000, Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, Dissertation

Zur Freisetzung ihres Genoms in das Innere der Wirtszelle müssen Hüllviren ihre Membran mit der Membran der Wirtszelle verschmelzen. Diese Fusion wird durch eine Konformationsumwandlung der Ektodomäne viraler Glykoproteine ausgelöst. Die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur der vollständigen Ektodomäne in der fusionsaktiven Konformation ist Voraussetzung für das Verständnis des Fusionsmechanismus.

Die Fusion von Influenza mit entsprechenden Targetmembranen wird durch eine durch sauren pH ausgelöste Konformationsänderung des als Trimer vorliegenden Glykoproteins Hämagglutinin (HA) vermittelt. Bis jetzt war die dreidimensionale (Röntgenkristall-) Struktur einer enzymatisch abgespaltenen HA-Ektodomäne nur eines Influenzastammes bei neutralem pH-Wert bzw. von einigen Fragmenten der HA2-Untereinheit bei saurem pH-Wert bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurden ein geeigneter Influenzastamm sowie geeignete Untersuchungsbedingungen ermittelt, um die 3D-Struktur des kompletten, nicht enzymatisch vorbehandelten HA sowohl in seiner nativen (bei neutralem pH-Wert vorliegenden) als auch in seiner fusionskompetenten (keinesfalls aber bereits inaktivierten) Struktur mittels Kryoelektronenmikroskopie und Bildverarbeitung aufzuklären.

Es wurde erstmals die 3D-Struktur des kompletten HA eines anderen Influenzastammes (A/Japan) bei neutralem pH-Wert aufgeklärt und mit der bekannten 3D-Struktur von Influenza X-31 verglichen. Außerdem konnte eine fusionskompetente Form rekonstruiert werden, die im Vergleich zur nativen Konformation deutliche Veränderungen in der 3D-Struktur zeigt, ohne daß sich jedoch die Assoziation der Monomere aufhob. Die Befunde werden unter anderem in Hinblick auf die Bedeutung der HA1-Untereinheit für die Fusion diskutiert.

Die vorgestellte Methode scheint geeignet, auch andere Membranproteine bzw. Membranfusionsvermittelnde Proteine in verschiedenen konformereren Zuständen aufzuklären (insbesondere jene, die der Röntgenkristallstrukturanalyse nicht zugänglich sind) und so einen diesen Fusionsprozessen eventuell zugrundeliegenden konservierten Funktionsmechanismus aufzuhellen.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	6
1. Einleitung	8
1.1. Das Influenzavirus	8
1.2. Die Spikeproteine	14
1.3. Das Hämagglutinin (HA)	14
1.3.1. Die fusionsaktive Konformation des HA	17
1.4. Die Fusion	20
2. Zielstellung	25
3. Material und Methoden	26
3.1. Verwendete Lösungen und Chemikalien	26
3.2. Vermehrung von Influenzaviren	27
3.2. Reinigung von HA	27
3.4. Proteinase K Verdauung	28
3.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	28
3.6. Zucht von HA-exprimierenden Zellen	28
3.7. Markierung von Viren mit Octadecylrhodamine B chloride (R18)	29
3.8. Markierung von Humanerythrozyten mit R18	29
3.9. Bindung fluoreszenzmarkierter Erythrozyten an Zellen	30
3.10. Herstellung offener Erythrozytenghosts	30
3.11. Herstellung von großen unilamellaren Vesikeln (LUV)	31
3.12. Inaktivierung der Viren durch Vorinkubation bei niedrigem pH-Wert	31
3.13. R18-Fluoreszenzsondenassay	32
3.14. bis-ANS-Fluoreszenzsondenassay	35
3.15. Präparation für die Elektronenmikroskopie	37
3.16. Elektronenmikroskopie	38
3.17. Digitalisierung der elektronenmikroskopischen Negative	38

3.18. Rechnergestützte Bildverarbeitung nach der Einzelpartikelmethode	38
4. Grundlagen der Bildverarbeitung: Einzelpartikelmethode und 3D-Rekonstruktion	39
4.1. Filterung und Normierung	40
4.2. Ausrichtung	40
4.3. Klassifizierung	46
4.4. Bildmittelung	49
4.5. Ermittlung der Eulerwinkel	49
4.6. Rückprojektion	54
4.7. Bestimmung der Auflösung	55
5. Ergebnisse	56
5.1. Ermittlung geeigneter Untersuchungsparameter	56
5.1.1. Fusionsverhalten	57
5.1.2. Variation der Temperatur	59
5.1.3. Rolle des Rezeptors	62
5.1.4. Inaktivierung	64
5.1.5. Verwendung HA-exprimierender Zellen	68
5.1.6. pH-Abhängigkeit der Fusion nach “commitment”	71
5.1.7. Zugänglichkeit für Proteinase K	73
5.2. 3D-Rekonstruktion von HA unter verschiedenen Bedingungen	75
5.2.1. 3D-Struktur des HA bei neutralem pH-Wert	84
5.2.2. 3D-Struktur des HA bei saurem pH-Wert und 4°C	87
5.2.3. 3D-Struktur des HA bei saurem pH-Wert und 37°C	90
6. Diskussion	92
6.1. Vergleich der neutralen 3D-Struktur des HA von Influenza X-31 mit der von Influenza A/Japan	93
6.1.1. Die Bedeutung der Glykosylierung des HA für die Struktur	101
6.2. Vergleich der 3D-Strukturen des HA von Influenza A/Japan bei neutralem pH und bei saurem pH, 4°C	106
6.3. Vergleich der 3D-Strukturen des HA von Influenza A/Japan bei saurem pH, 4°C und bei saurem pH, 37°C	110

6.4. Relevanz der Befunde für die bestehenden Fusionsmodelle	114
7. Resümee und Ausblick	117
8. Anhang	119
Literaturverzeichnis	119
Danksagung	136
Lebenslauf	137
Veröffentlichungen	138

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
Å	Angström (0,1 nm)
AA	Aminosäure(reste)
AFM	Atomic force microscopy (Rasterkraftmikroskopie)
BHA	durch Bromelain abgespaltene Ektodomäne des Hämagglutinins
bis-ANS	1,1'-bis(4-anilino)naphthalene-5,5'-disulfonsäure
CD-(Spektroskopie)	Zirkularer Dichroismus (Spektroskopie)
CCF	Kreuzkorrelationsfunktion
Da	Dalton, Molgewichtseinheit (g/mol)
DOPC	Dioleylphosphatidylcholin
EHA2	kristallisiertes Fragment der HA2 Untereinheit
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
FBS	fetales Rinderserum
FDQ	Fluoreszenzdequenching
F	Fluoreszenzintensität
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethansulfonsäure
HA	Hämagglutinin
HA0	fusionsinaktiver Precursor des HA
HA1, HA2	Untereinheiten des Hämagglutinins
HEF	Hämagglutinin-Esterase-Fusions-Glykoprotein
HIV	Human Immunodeficiency Virus
LPC	Lysophosphatidylcholin
LUV	Large unilamellar vesicle: große unilamellare Lipidvesikel
M1	Matrixprotein 1
M2	Matrixprotein 2
M _r	Molgewicht
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MSA	Multivariate statistische Analyse

MRA	Multi-Referenz-Alignement
NA	Neuraminidase
NaAc	Natriumacetatpuffer
NS	Nichtstrukturprotein
OG	n-Octyl- β -D-glucopyranosid
PAS	Perjodsäure/Schiffsches Reagenz
PBS	Phosphate buffered saline: Phosphatpuffer
PCTF	Phasen-Kontrast-Übertragungsfunktion
PE	Phosphatidyl-ethanolamin
PTA	Phospho-Wolfram-Säure
R18	Octadecylrhodamine B chloride
RCF	Drehkorrelationsfunktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
S^2/N^2	Signal zu Rauschverhältnis
SDS-PAGE	Na-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SIV	Simian Immunodeficiency Virus
SUV	Small unilamellar vesicle: kleine unilamellare Lipidvesikel
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
TBHA2	kristallisiertes HA-Fragment (vorwiegend HA2 Untereinheit)

1. Einleitung

Obgleich der Begriff der "Unit membrane" nicht der Vielfalt in Funktion und Zusammensetzung biologischer Membranen gerecht wird, weist er doch auf das prinzipiell gleiche Bauprinzip solcher Membranen hin, das heute - wenngleich nicht unumstritten - allgemein mit dem "fluid mosaic model" erklärt wird. Aus dieser weiten prinzipiellen Übereinstimmung erklärt sich das große Interesse für das Verständnis elementarer Mechanismen, welche den spezifischen Funktionen der Membranen zugrunde liegen.

Einer dieser grundlegenden Mechanismen ist die Verschmelzung biologischer Membranen, zum Beispiel bei der intrazellulären Fusion von Membranen wie im Falle der Verschmelzung von Pino- oder Endozytosevakuolen mit Lysosomen zu sekundären Lysosomen, bei der Verschmelzung von Eizellen und Spermatozoen im Rahmen der geschlechtlichen Fortpflanzung oder aber bei der Fusion der Membranen von Hüllviren mit der Membran ihrer Wirtszelle zum Zwecke der Freisetzung des Virusgenoms in das Zellplasma (Uncoating).

Das letzte Beispiel, die Fusion von Hüllviren mit ihren Wirtszellen, bietet einen guten Ansatzpunkt zur Aufklärung eines Fusionsmechanismus. Sowohl die Spezifität dieses Prozesses als auch der Fusionsvorgang selbst wird durch Membranproteine vermittelt. Durch Aufklärung der Mechanismen proteinvermittelter Membranfusion können möglicherweise allgemeingültige Prinzipien der Membranverschmelzung gefunden werden. Darüber hinaus erhofft man sich dadurch im Falle viraler oder durch virale Glykoproteine vermittelter Membranfusion einerseits einen besseren Schutz vor Viren als Erreger von Infektionskrankheiten, andererseits verspricht die Nutzung einer künstlich induzierten Fusion (z.B. mit speziellen "Carriersystemen") weitere Fortschritte in Medizin, Genetik und Biotechnologie. Demnach liegt es also nahe, Viren als Modellsystem zum Studium proteinvermittelter Membranfusion auszuwählen.

1.1. Das Influenzavirus

Was für die Modellrolle der Viren im allgemeinen, gilt für das Influenzavirus im besonderen. Kaum ein Virus ist besser untersucht, vor allem bezüglich des die Membranfusion vermittelnden Proteins. Darüber hinaus steht die unmittelbare klinische Bedeutung des Influenzavirus außer

Frage. Die große Influenzapandemie von 1918 forderte schätzungsweise 20 Millionen Menschenleben, darunter besonders viele 20-30jährige. Die drastischen Maßnahmen, die 1997 in Hongkong ergriffen wurden, nämlich die Tötung allen Geflügels, das als Infektionsquelle für eine neue Influenzavariante ermittelt worden war, belegt eindrucksvoll die Furcht vor einer neuen Pandemie.

Der Genus "Influenzavirus" gehört zu der Familie Orthomyxoviridae und umfaßt die Arten Influenza A, Influenza B und Influenza C. Es handelt sich hierbei im Menschen und bei Frischisolaten um filamentöse und nach einigen Laborpassagen im Hühnerembryo um meist sphärische Viren mit einem Durchmesser von 80-120 nm und einem Molekulargewicht von $4-5 \cdot 10^6$ Da (Abbildung 1).

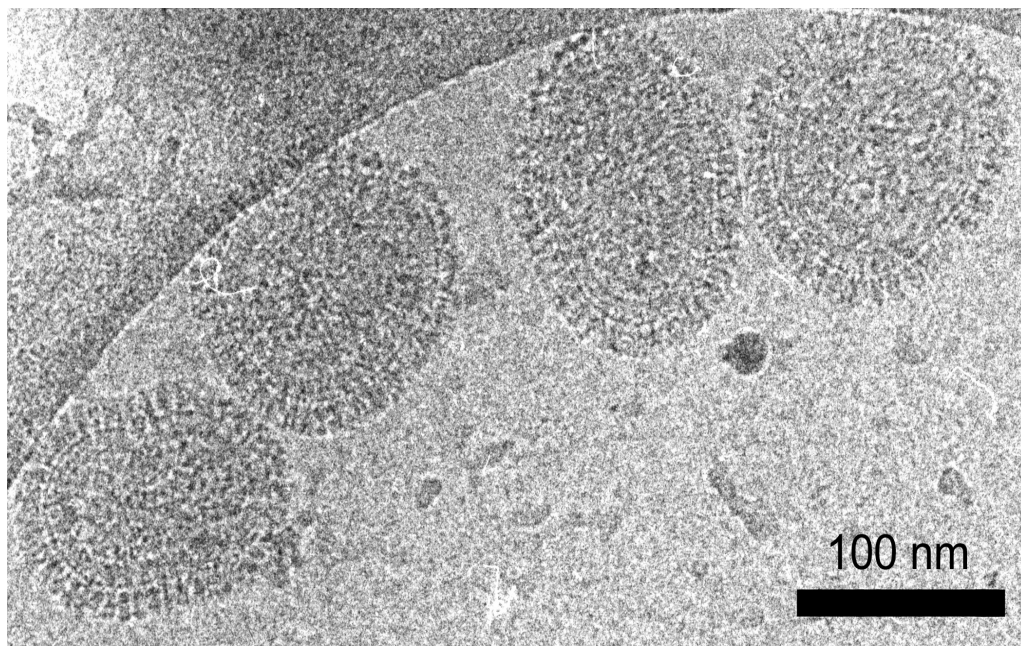


Abbildung 1

a) Kryo-Elektronenmikroskopisches Bild von eiseingebetteten Influenza A -Virionen (oberhalb des Eisloches ist der Rand der Kohlelochfolie zu erkennen)

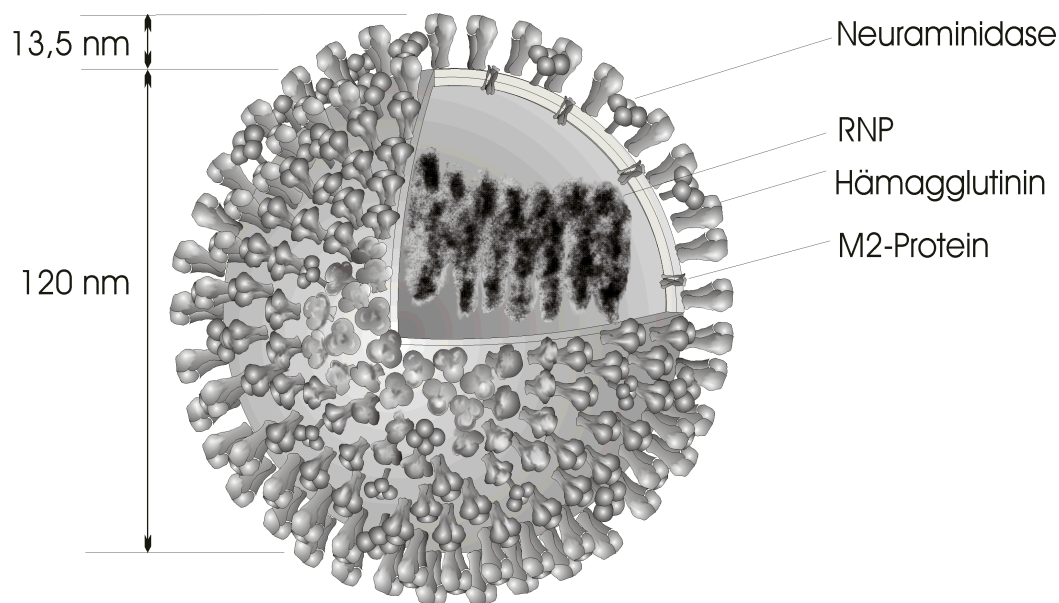


Abbildung 1 b) Schematische Darstellung eines Influenza-Virions

Wie alle Viren, die ja oft als “vagabundierende Gene” charakterisiert werden, besitzt auch Influenza nur einen Typ von Nukleinsäure, und zwar RNA. Diese liegt jedoch als in acht Teile segmentierte Einzelstrang-RNA (s-s-RNA) vor und besitzt eine negative Polarität, das heißt, das Genom muß zum Zwecke der Replikation zuerst in einen Komplementärstrang transkribiert werden, der dann als mRNA wirken kann. Deshalb muß die “Replikase” schon vom Virus mitgebracht werden, sie liegt im Virion in Form des Polymerasekomplexes, der aus drei hochmolekularen Proteinen (PA, PB1, PB2) mit unterschiedlichen Funktionen besteht, vor.

Allerdings ist die zelluläre und virale Transkription bei den Myxoviren eng verflochten, was sich auch in der Tatsache manifestiert, daß die RNA-Synthese nicht, wie sonst bei den RNA-Viren, im Zytoplasma, sondern im Kern der Wirtszelle abläuft (Abbildung 2).

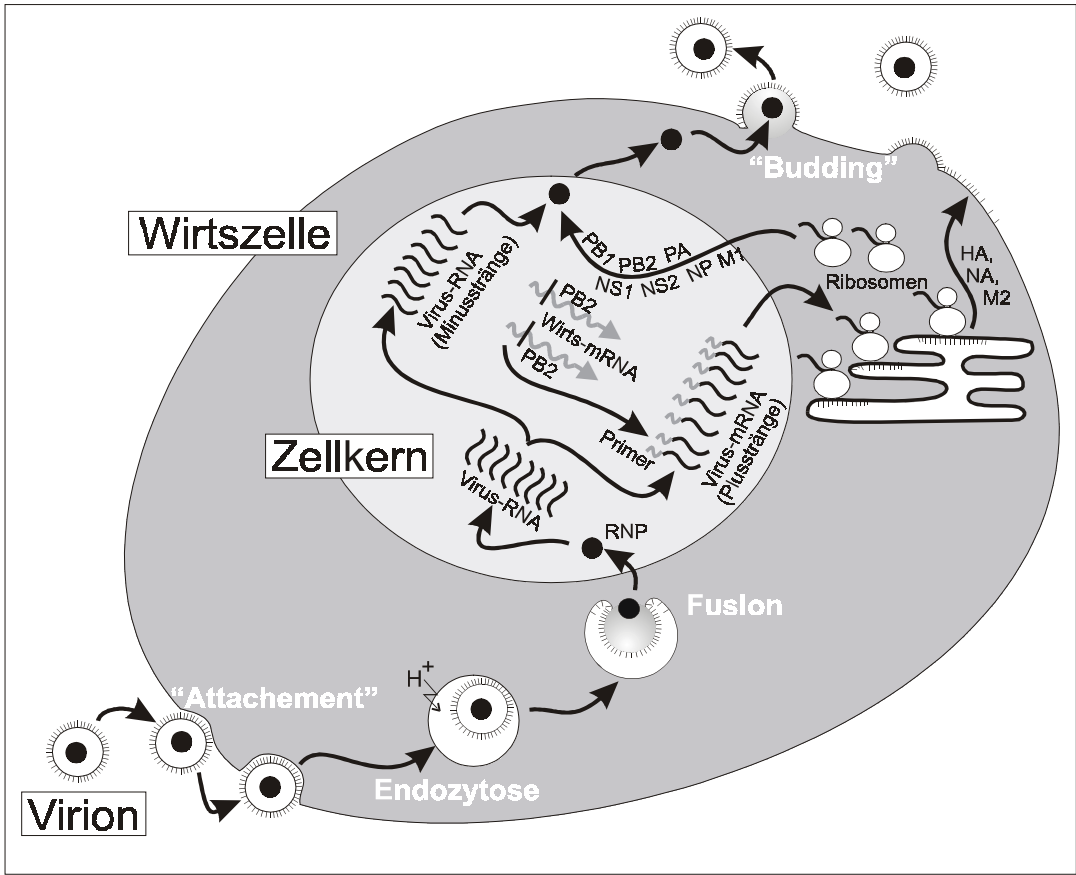


Abbildung 2 Schematische Darstellung des Vermehrungszyklus von Influenza

Das Kapsidprotein von Influenza (Nukleoprotein, NP, Molekulargewicht 50-65 kDa) ist dicht um die RNA angeordnet und formt so das Ribonukleoprotein (RNP). Das Ribonukleoprotein bildet das sogenannte Nukleokapsid, welches als Doppelhelix mit nun 5-10fach größerem Durchmesser als die primäre Nukleinsäurespirale vorliegt. An das RNP ist das Matrixprotein M1 (oder MP1) chemisch gebunden. M1 stabilisiert die das Kapsid umgebende Hülle von innen her. Diese Hülle ('envelope') besteht aus Lipiden, deren Zusammensetzung sich von der zellulären Membran des Wirtes ableitet, und enthält drei integrale Membranproteine:

Das homotetramerische M2-Protein (Molekulargewicht 15 kDa) besitzt eine pH-regulierte Ionenkanalaktivität und verhindert den Verlust der Fusogenität des Virus (=Inaktivierung) während der Reifungs- und Transportphase des Virus in der Wirtszelle. Außerdem ist es wichtig für die Dissoziation des Nukleokapsids während des Viruseintritts in die Zelle [Pinto et al.,

1992, Wang et al., 1993, 1994]. Die Funktion der als Nichtstrukturproteine bezeichneten NS 1 (Molekulargewicht ca. 25 kDa) und NS 2 (Molekulargewicht ca. 12 kDa) ist noch unbekannt. Die typische im Elektronenmikroskop sichtbare Morphologie des Virions wird durch Protrusionen oder “spikes” geprägt, welche durch die Proteine Hämagglutinin (HA) (Molekulargewicht 75 - 80 kDa, ca. 500-1000 Kopien/Virion) und Neuraminidase (NA) (Molekulargewicht ca. 60 kDa, ca. 100 Kopien/Virion) gebildet werden (siehe auch Abbildung 1).

Diese beiden Glykoproteine bilden die wichtigsten Antigene der klinisch bedeutsamen Influenzatyphen A und B. Da bei der Replikation der viralen RNA kein Korrekturmechanismus (“proofreading”) für Kopierfehler existiert, ist die Mutationsrate sehr hoch, sie liegt bei etwa 10^{-5} [Parvin et al., 1986], d.h. jede Kopie einer Virus-RNA von 100.000 Nukleotiden enthält durchschnittlich eine Mutation. Durch die hohe Vermehrungsrate und unter entsprechendem Selektionsdruck entstehen sehr schnell Viren mit neuen Eigenschaften. Neben dieser *Antigen-Drift* tritt aber bei Influenza A *Antigen-Shift* auf. Bei Doppelinfektionen durch zwei verschiedene Influenzastämme bringt jeder acht RNA-Segmente mit, die jeweils für ein oder zwei verschiedene Proteine kodieren. Die Neukombination dieser 16 RNA-Segmente kann zu maximal 254 individuellen “reassortants” führen [Scholtissek, 1996]. Die Aminosäuresequenz von HA und NA als wichtigste Oberflächenantigene dient zur Einteilung des Influenza A in Subtypen: Zum jetzigen Zeitpunkt sind 15 HA- und 9 NA-Subtypen bekannt. Daraus leitet sich die Bezeichnung des Antigen-Subtypen ab (Nomenklatur von Influenza siehe Tab. 1). Da Influenza A im Gegensatz zu den nur beim Menschen vorkommenden Influenza B und C ein sehr breites Wirtsspektrum umfaßt, besteht zudem theoretisch die Möglichkeit, daß Influenza A-Viren die Spezies-Barriere durchbrechen, was auch tatsächlich der Fall ist. Bei der “Asiatischen Grippe” von 1957 und der “Hongkong-Grippe” von 1968 gingen Gene von Wassergeflügel-Influenza auf humane Influenza A-Viren über, die Subtypen H2N2 bzw. H3N2 entstanden. Da diese Spezies-Barriere beim Schwein besonders niedrig ist, könnten Schweine als “mixing-vessels” fungieren, was auch den Ursprung aller Influenza-Pandemien im Südostasiatischen Raum durch das dortige enge Zusammenleben von Menschen mit Schweinen und Wassergeflügel erklären würde [Scholtissek, 1996]. Allerdings scheint die “Hongkong-Grippe” von 1997 erstmals direkt vom Vogel auf den Menschen übergegangen zu sein [Centers for

Disease Control and Prevention, 1997].

Typ ("Art") von Influenza (auf Basis der Antigenität von NP bzw. MP)	A
Ort der ersten Isolation	PR (= Puerto Rico)
Anzahl der Isolate	8
Jahr der Isolation	34
Antigenformel (Typ von HA bzw. NA)	(H1N1)

Tab. 1: Nomenklatur von Influenza am Beispiel von Influenza A/PR8/34 (H1N1)

Die einzelnen HA-Subtypen unterscheiden sich in mindestens 30% der Aminosäuresequenz, aber auch innerhalb der Subtypen differiert die Aminosäuresequenz von Stamm zu Stamm. Daß trotz dieser hohen Variabilität in der Aminosäuresequenz die Funktionalität offenkundig erhalten bleibt, ist ein erster Hinweis für ein übergeordnetes konserviertes Funktionsprinzip. Wenn also die Primärsequenz sehr variabel ist, was unter dem Gesichtspunkt des Unterlaufens der immunologischen Abwehr des Wirtes aus Sicht des Virus ja auch "sinnvoll" scheint, sollte den dreidimensionalen Strukturmerkmalen der Spikeproteine für deren Funktion eine um so höhere Bedeutung zukommen.

1.2. Die Spikeproteine

Der erste Schritt einer Influenzavirusinfektion ist immer die Bindung des Virions an die Wirtszelle. Als zellulärer Rezeptor wirkt Sialinsäure (N-Acetylneuraminsäure), die am Ende von Oligosacchariden verschiedener Zelloberflächenmoleküle in großer Anzahl zur Verfügung steht. Virusseitig vermittelt das HA diese Bindung (siehe unten). Nach dem Budding oder Release von neugebildeten Virionen, deren Envelope ja von der Wirtszelle abstammt, sind diese zunächst von einem Sialinsäuremantel umgeben. Aufgabe der Neuraminidase ist die enzymatische Spaltung der Sialinsäure. Ohne diese käme es zur Aggregation der neugebildeten Virionen untereinander oder mit der Wirtszelle [Palese et al., 1974]. Neue Medikamente gegen Influenza (z.B. "Zanamivir") nutzen genau diesen Umstand und blockieren die Neuraminidaseaktivität. Eventuell könnte NA darüber hinaus für eine Abtrennung des HA von seinem Rezeptor nötig sein [Huang et al., 1980]. Die dreidimensionale Struktur der tetramerischen Neuraminidase ist 1983 röntgenkristallografisch aufgeklärt worden [Varghese et al., 1983], ihr enzymatisch aktives Zentrum ist bekannt.

Ein Sonderfall liegt bei Influenza C vor. Influenza C besitzt keine Neuraminidase, sondern deren Funktion wird von dem Hämagglutinin-Esterase-Fusions-Glykoprotein (HEF) mit übernommen [Herrler & Klenk, 1991]. HEF (oder auch HE oder gp88 (M_r 88000 glycoprotein)) ist das einzige Spikeprotein des Influenza C, es ist im Gegensatz zum Hämagglutinin (siehe unten) von Influenza A und B in hexagonalen Arrays auf der Virusoberfläche angeordnet [Compans et al., 1977]. Die dreidimensionale Struktur der Ektodomäne des HEF bei neutralem pH-Wert konnte vor kurzem mit einer Auflösung von 3,5 Å bestimmt werden [Rosenthal et al., 1998]. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit aber keine Untersuchungen an Influenza C durchgeführt wurden, soll darauf nicht weiter eingegangen werden.

1.3. Das Hämagglutinin (HA)

Das zweite Spikeprotein von Influenza A und B ist das Glykoprotein Hämagglutinin (HA, M_r =84000 Da). HA vermittelt sowohl die Bindung von Influenza an die Wirtszelle als auch die Fusion der Membran des Influenzavirus mit der Membran der Wirtszelle [Wiley & Skehel, 1987; White, 1992]. Es stellt 25-30% des Virusproteins von Influenza und kommt in ca. 500 bis

1000 Kopien pro Virion vor. HA bildet noch im Endoplasmatischen Retikulum ein glykolysiertes Homotrimer aus dem fusionsinaktiven primären Translationsprodukt HA0. Erst durch posttranslationale proteolytische Spaltung entsteht das fusionskompetente HA-Trimer [Klenk et al., 1972; Skehel, 1972]. Die dazu nötigen Proteasen müssen in der Wirtszelle vorliegen (was auch die Präferenz bestimmter Gewebe für die Infektion erklärt, bei Influenza der Respirationstrakt), können aber auch durch eine bakterielle Koinfektion bereitgestellt werden und dann extrazellulär wirken [Tashiro et al., 1996]. Dabei entstehen pro Monomer zwei Unter-einheiten, HA1 (328 Aminosäuren) und HA2 (221 Aminosäuren), die über eine Disulfidbrücke (HA1 14 mit HA2 137) [Wilson et al., 1981] miteinander verbunden sind. Dabei bildet HA1 den bezüglich der Virusmembran distal orientierten globulären Kopf und einen Teil des fibrinogenen Stammes. Im Kopfbereich sitzt pro Monomer eine Bindungsstelle für den zellulären Rezeptor. Dieser wird immer von Sialinsäureresten (N-Acetylneuraminsäure) gebildet, allerdings in Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz von HA1 in bestimmten bevorzugten Konformationen (beispielsweise terminal an D-Galactose- oder D-Galactosaminresten gebunden).

Das proximal orientierte HA2 bildet den Stamm, die Transmembrandomäne (24-28 hydrophobe Aminosäuren) sowie die zytoplasmatische bzw. intravirale Domäne (10-15 überwiegend hydrophile Aminosäuren).

Die gesamte Ektodomäne ragt etwa 135 Å aus der Membran heraus, was mehr als 85% der Proteinmasse entspricht. Diese Ektodomäne kann durch Bromelain abgespalten werden (bromelain-cleaved HA, BHA). Das BHA vom Influenza A-Stamm X-31 konnte kristallisiert werden und seine molekulare Struktur konnte mittels Röntgenkristallstrukturanalyse mit einer Auflösung von 3 Å bestimmt werden [Wilson et al., 1981] (Abbildung 3). Allerdings ist HA in dieser Struktur nicht in der Lage, Membranfusion auszulösen (siehe nachfolgend).

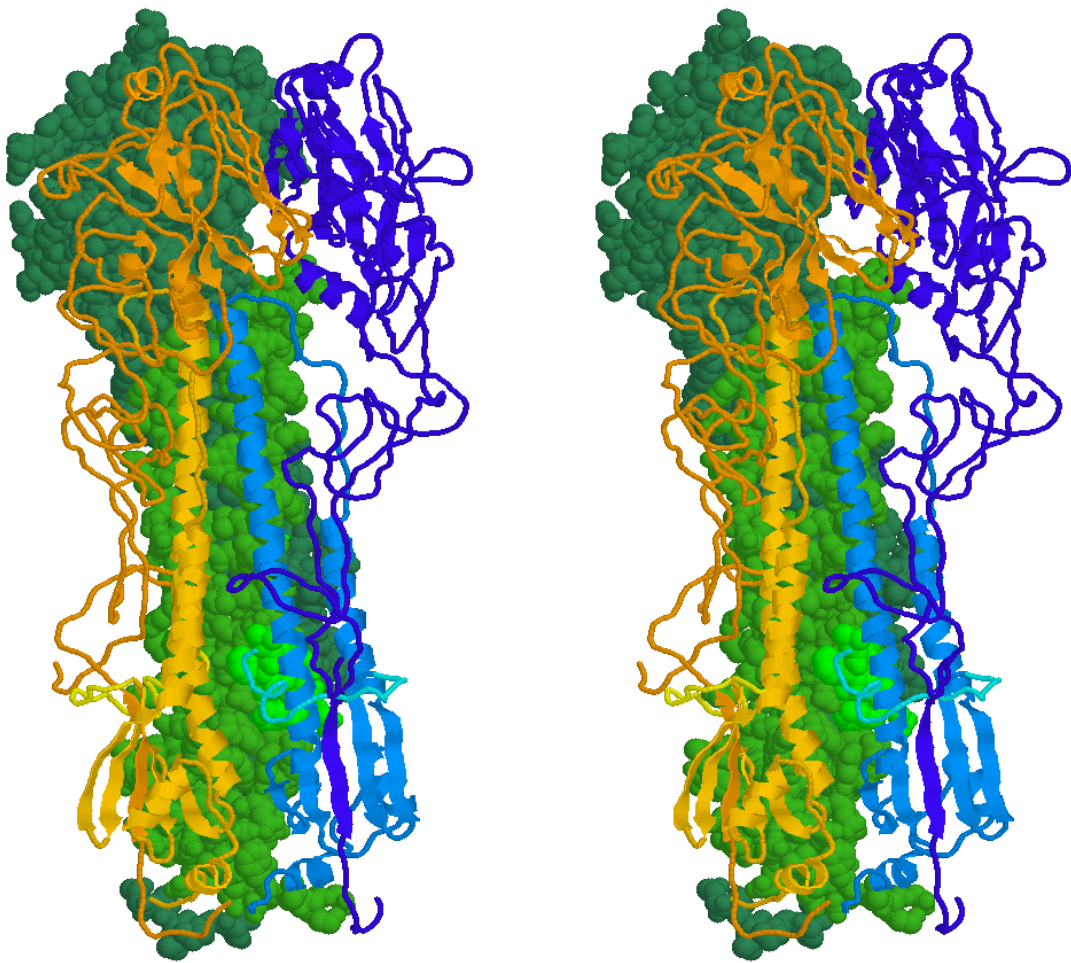


Abbildung 3

Stereodarstellung der Röntgenkristallstruktur des HA von Influenza X-31 (verwendeter pdb-Eintrag: 4hmg)

Die einzelnen Monomere sind in gelb, blau bzw. grün dargestellt, innerhalb jedes HA-Monomers kennzeichnet der dunkelste Farbton die HA1-Untereinheit, der mittlere Farbton die HA2-Untereinheit und der hellste Farbton den hydrophoben N-Terminus der HA2-Untereinheit (“Fusionspeptid”)

(Abbildung erstellt mit RasMol 2.6)

1.3.1. Die fusionsaktive Konformation des HA

Zur Auslösung der Fusion bedarf es zwingend einer Reduzierung des pH-Wertes. Diese pH-Wert-Erniedrigung führt zu einer erheblichen irreversiblen Änderung der Konformation des HA, die eine Membranfusion erst ermöglicht [Doms 1993; Bullough et al., 1994; Hughson, 1995]. Die pH-neutrale und noch nicht fusionsaktive Struktur des HA entspricht einer metastabilen Konformation [Carr et al., 1997]. Der Hauptteil der benötigten Energie für die Konformationsänderung wird wahrscheinlich schon bei der Faltung des HA analog einer gespannten Falle gespeichert [Stuart, 1994], die pH-Erniedrigung stellt lediglich den “Schalter” für die Konformationsänderung dar. Da Orthomyxoviren wie viele andere Hüllviren (z.B. Rhabdoviren, Togaviren, Bunyaviren) nach der Bindung endozytiert werden, wird in vivo während der Reifung des Endosoms diese notwendige Absenkung des pH-Wertes im endosomalen Lumen gewährleistet (Abbildung 2).

In vitro können die Influenzaviren nach Bindung an geeignete Membranen auch ohne den “Umweg via Endozytose” durch pH-Erniedrigung des sie umgebenden Mediums direkt zur Fusion veranlaßt werden. Die pH-Wert-Erniedrigung in Abwesenheit geeigneter Zielmembranen geht im allgemeinen mit dem irreversiblen Verlust der Fusionsaktivität einher [Skehel et al., 1982; Stegmann et al., 1987], im folgenden als “Inaktivierung” bezeichnet.

Die fusionsaktive Struktur des HA ist bisher noch unbekannt. Wie wir mittels Analyse der Hydrophobizität bei neutralem und saurem pH-Wert zeigen konnten, führt die pH-Erniedrigung zu einer erheblichen Erhöhung der Hydrophobizität des HA [Korte et al., 1992], was wahrscheinlich eine Kristallisation der fusionsaktiven Konformation unmöglich macht.

Lediglich die dreidimensionale Struktur eines durch Trypsin- und Thermolysinbehandlung erhaltenen Fragmentes von BHA (TBHA2) bei niedrigem pH-Wert konnte durch Wiley und Mitarbeiter aufgeklärt werden [Bullough et al., 1994]. TBHA2 besteht aus den Aminosäuren 12-16 von HA1 und 40-153 von HA2. Abbildung 4 verdeutlicht die Änderungen zu der pH-neutralen Struktur.

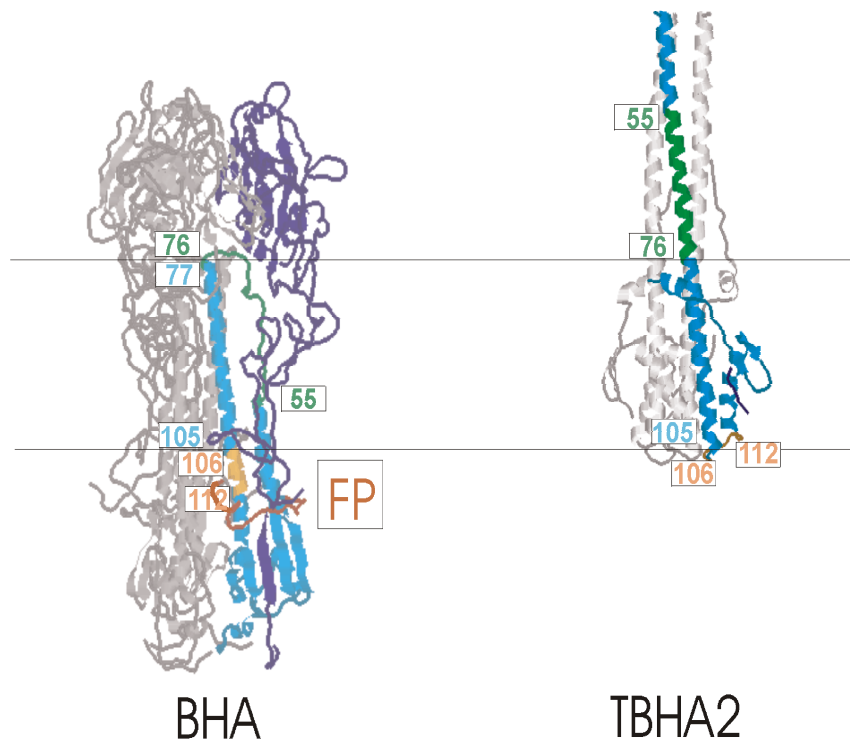


Abbildung 4 Vergleich der Röntgenkristallstruktur von BHA und TBHA2 (nähere Erläuterungen siehe Text)

Die erste wesentliche Änderung: Der Loop im HA2 (AA 55-76, in Abbildung 4 cyan) wird zum Bestandteil einer trimeren “coiled-coil”-Struktur. Dieser Loop-zu-Helix-Übergang wurde bereits nach Untersuchungen an synthetischen Peptiden entsprechender Sequenz vorausgesagt [Carr & Kim, 1993]. Am Ende dieser “coiled-coil”-Struktur würde sich die sogenannte (durch Thermolysinbehandlung abgespaltene) “Fusionssequenz” befinden (also in Abbildung 4 am

oberen Ende des TBHA2). Dieser auch als Fusionspeptid bezeichnete und in allen Influenzastämmen hochkonservierte ca. 20 Aminosäuren lange hydrophobe N-Terminus von HA2 ist bei neutralem pH-Wert ca. 35 Å von der viralen Membran und ca. 100 Å vom distalen Ende des HA entfernt geschützt in die Stammregion eingebettet (in Abbildung 4 rotbraun dargestellt). Die konservierte Aminosäuresequenz der Fusionssequenz, die Tatsache, daß Punktmutationen in dieser Sequenz die Fusionsaktivität von HA stark beeinflussen sowie das Vorhandensein ähnlicher Peptide bei Fusionsproteinen anderer Viren (z.B. beim F-Protein von Sendai-Viren [Gething et al., 1978] oder beim gp41 Protein von HIV [Gallaher, 1987]) weisen auf deren wichtige Rolle für die Fusion hin. Wie Untersuchungen mit Antikörpern gezeigt haben, wird diese Fusionssequenz in einer sehr frühen Phase der Konformationsumwandlung des HA exponiert [White & Wilson, 1987]. Bei Anwesenheit der Targetmembran tritt die Fusionssequenz mit dieser in Kontakt [Harter et al., 1989; Stegmann et al., 1991; Durrer et al., 1996], was eventuell sogar für den weiteren Verlauf der Fusion das HA1 mit seiner Rezeptorbindungsstelle funktionell überflüssig macht [Schoch et al., 1992]. Durch FTIR-Messungen mit dem isolierten Fusionspeptid konnte in Zusammenarbeit der Gruppe von J.-M. Ruyschaert und unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, daß das Fusionspeptid in einem bestimmten Winkel schräg in die Membran eintaucht [Lüneberg et al., 1995].

Der im TBHA2 beobachtete Loop-zu-Helix-Übergang würde sehr gut die für ein Eintauchen in die Zielfmembran erforderliche Delokalisation des Fusionspeptides über die Entfernung von ca. 100 Å hin zum distalen Ende des HA erklären.

Die zweite wesentliche Änderung in der (sauren) TBHA2-Struktur im Vergleich zur (neutralen) BHA-Struktur ist ein Helix-zu-Loop-Übergang im HA2 (106-112). Zusammen mit der Tatsache, daß die 31 carboxyterminalen Aminosäuren im TBHA2 nicht lokalisiert werden konnten (vermutlich wegen ihrer hohen Flexibilität), bleibt die Orientierung von TBHA2 (und damit dem Fusionspeptid) relativ zur Membran völlig offen. Durch Untersuchungen mittels photoaktivierbarer 'cross-linking'-Reagenzien konnte gezeigt werden, daß die Inaktivierung des HA mit dem Eintauchen des Fusionspeptides in die virale Membran verbunden ist [Weber et al., 1994]. Dafür müßte die dem Fusionspeptid vorausgehende Helix proximal und der entstandene Loop (AA 106-112, in Abbildung 4 orange) distal zur Virusmembran orientiert sein. Tatsächlich

konnte mittels Elektronenmikroskopie von Antikörperkomplexen gezeigt werden, daß bei in niedrigem pH vorinkubiertem intaktem HA genau dieser Bereich des HA2 (AA 106-112) distal zur Virusmembran orientiert zu sein scheint [Wharton et al., 1995]. Damit liegt die Annahme nahe, daß die für das TBHA2 aufgelöste Struktur mit der inaktivierten Struktur des HA assoziiert ist. Das schließt aber nicht aus, daß diese Struktur auch Bestandteil (oder Endzustand) der Kaskade ist, die das HA im Laufe der Fusion durchläuft. Diese Struktur sollte dann aber nicht eine Vorläuferstruktur bzw. die auslösende Struktur der Fusion sein, allenfalls könnte sie relativ spät in der Abfolge mehrerer Intermediate eingenommen werden. Für letzteres spricht die Tatsache, daß zur Ausbildung einer solchen Struktur wie im TBHA2 die HA1-Untereinheiten dissoziieren müßten [Skehel et al., 1995]. Einige Arbeiten liefern aber Hinweise darauf, daß die Monomere des HA relativ eng assoziiert bleiben [Puri et al., 1990; Stegmann et al., 1990; Shangguan et al., 1998].

Da die Dissoziation der HA1-Untereinheiten einen weitgehenden Verlust der Tertiärstruktur des HA zur Folge hätte, bietet sich die CD-Spektroskopie als Untersuchungsmethode an. Wir konnten durch CD-Messungen und parallel durchgeführte Fusionsmessungen (bei jeweils unterschiedlichen Bedingungen und mit verschiedenen HA-Subtypen) zeigen, daß für die fusionsaktive Struktur kein Verlust der Tertiärstruktur auftritt, sondern daß dieser tatsächlich mit der inaktivierten Konformation assoziiert zu sein scheint [Korte et al., 1997].

Zusammenfassend muß -und dies ist wesentlich für die Motivation der vorliegenden Arbeit- festgestellt werden, daß die zum Verständnis des Fusionsvorganges so wichtige dreidimensionale Struktur des vollständigen HA in dem Konformationszustand, der die Membranfusion ermöglicht, noch nicht aufgeklärt ist!

1.4. Die Fusion

Es konnte bis jetzt noch kein umfassendes und schlüssiges Modell für die Membranfusion von Influenzaviren mit ihren Zielzellen aufgestellt werden. Die Gründe dafür sind vielfältig: Neben der - wie eben erwähnt - noch unbekannten dreidimensionalen Struktur(en) des HA während der Fusion liegt dies sicher auch an der kurzen Lebensdauer der Intermediate und damit an deren Unzugänglichkeit für geeignete Untersuchungen. Unabhängig davon existieren jedoch eine

Reihe von “Arbeitsmodellen”, die versuchen, eine kaum noch zu überblickende Fülle an experimentellen Befunden zu berücksichtigen. Der Fakt, daß es selbst zwischen den einzelnen Influenza-Stämmen zum Teil erhebliche Unterschiede im Fusionsverhalten gibt, erschwert die Findung allgemeingültiger Prinzipien für den Fusionsprozeß zusätzlich.

Einige Merkmale haben nahezu alle zur Zeit existierenden Modelle zur HA-vermittelten Membranfusion gemein. Auf die wichtigsten soll im folgenden etwas näher eingegangen werden.

Zuerst binden die HA-Trimere bei neutralem pH-Wert an die Zielmembran. Obwohl auch eine unspezifische Anlagerung (zum Beispiel an rezeptorlose Liposomen) nach pH-Wert-Erniedrigung letztlich zur Fusion führen kann, ist eine spezifische Bindung für eine effiziente Fusion unabdingbar, wahrscheinlich wegen der korrekten HA-Anordnung an der Fusionsstelle [Lima et al., 1995; Stegmann et al., 1995]. Allerdings existieren auch Vorstellungen, daß jene HA, die an Rezeptoren binden, nicht gleichzeitig die Fusion vermitteln. Sie könnten aber dennoch wichtig für die richtige Organisation der Fusionsstelle sein (siehe unten) [Ellens et al., 1990; Alford et al., 1994]. Nachdem der saure pH-Wert die Konformationsänderung des HA (oder eine Sequenz mehrerer Konformationsänderungen) ausgelöst hat, wird das Fusionspeptid exponiert und tritt mit der Zielmembran in Kontakt [Harter et al., 1989; Stegmann et al., 1991; Durrer et al., 1996]. Einige Autoren nehmen die Wechselwirkung des Fusionspeptides auch mit der viralen Membran im Zuge der Fusion als möglich an [Stegmann et al., 1990; Kozlov & Chernomordik, 1998], diese kann aber auch Merkmal der Inaktivierung sein [Weber et al., 1994]. Es gibt Hinweise darauf, daß dieser erste Abschnitt der Fusion - die Konformationsumwandlung des gesamten HA - der einzige ist, der notwendig von einem sauren pH-Wert abhängt. Nach Bindung läßt sich durch anschließende Vorinkubation bei niedrigen Temperaturen und saurem pH-Wert ein sogenannter “commitment”-Zustand auslösen [Schoch et al., 1992]. Danach läuft die Fusion auch bei neutralem pH-Wert ab.

Diesem ersten Schritt der Fusion folgt ein sogenanntes “lag” [Herrmann et al., 1993; Ludwig et al., 1995]. Diese “lag”-Phase ist vor allem abhängig von der Temperatur, aber auch von der HA-Dichte, dem Vorhandensein von Rezeptoren oder der Lipidzusammensetzung der Membranen [Clague et al., 1991; Stegmann et al., 1990, 1995; Danieli et al., 1996; Herrmann et al., 1993].

Unter Verwendung HA-exprimierender Zellen anstelle der Viren gelang es, deutlichere Hinweise auf die schon vorher vermutete nötige Kooperativität mehrerer HA-Trimere [Ellens et al., 1990; Blumenthal, 1991] zu erhalten. Durch kinetische Analysen ("Hill-Plot") des "Lipidmixings" infolge von Fusion mit Zelllinien unterschiedlicher HA-Oberflächendichte wurde eine Kooperation von mindestens 3-4 HA-Trimeren pro Fusionsstelle als erforderlich ermittelt [Danieli et al., 1996]. Blumenthal und Mitarbeiter verfolgten die Änderung des Membran-Potentials sowie die Lipid- und Inhaltsvermischung infolge von Fusion von Erythrozytenghosts und HA-exprimierender Zellen und paßten die erhaltenen Kinetiken mit einer empirischen Gleichung an [Blumenthal et al., 1996]. Sie halten eine Kooperation von mindestens sechs HA-Trimeren pro Fusionsstelle für erforderlich. In einer jüngst erschienenen Arbeit ermittelte Bentz durch Modellierung bestehender Meßdaten mindestens acht HA-Trimere pro Fusionsstelle [Bentz, 2000a]. Doms und Helenius hatten schon im elektronenmikroskopischen Bild rosettenförmige HA-Assoziate auf der Virusoberfläche beobachtet [Doms & Helenius, 1986]. Die Bildung dieser "cluster" von HA-Trimeren spielt sich also wahrscheinlich innerhalb der "lag"-Phase ab.

Allerdings findet durch die Bildung eines solchen ringförmigen Fusionskomplexes noch keine Annäherung der Membranen statt. Frühere Annahmen, die durch die Konformationsumwandlung und durch Exponierung des Fusionspeptides sehr hydrophob gewordenen HA-Trimere würden den durch sie umschlossenen Raum dehydrieren, was zu einer Störung der Membranhomogenität und schließlich zu einer Lipidpore führt [Bentz & Ellens, 1988], werden mehr und mehr von der Vorstellung verdrängt, daß sich die HA-Trimere um eine "Scharnierregion" beugen müssen, um damit die nötige Annäherung der Membranen zu gewährleisten [Wharton et al., 1995]. Während der tatsächliche Prozeß der Annäherung beider zu verschmelzender Membranen und die Rolle des HA dabei noch sehr hypothetisch sind, gibt es für die nachfolgenden Schritte der Lipidvermischung beider Membranen und der Bildung einer Pore, die die Vermischung der wäßrigen Inhalte der zu fusionierenden Kompartimente ermöglicht, konkrete Hinweise. Diese fußen auf der zeitlichen Auflösung von Intermediaten (zum Beispiel durch die Wahl suboptimaler physikochemischer Fusionsbedingungen), die im nativen Fusionsgeschehen sehr schnell durchlaufen würden.

Entsprechend der inzwischen am weitesten verbreiteten Auffassung ist der erste dieser nachfolgenden Schritte die Bildung eines Hemifusionsintermediates. Dabei verschmelzen die jeweils äußeren Lipidlayer der beiden Membranen miteinander. Mit einer HA-Mutante, bei der die HA-Ektodomäne an Glycosylphosphatidylinositol (GPI) als lipidischem Anker gebunden ist, läßt sich die Hemifusion beobachten [Kemble et al., 1994; Melikyan et al., 1995; Nüßler et al., 1997]. In Zusammenarbeit mit M. Clague konnte in unserer Arbeitsgruppe ein Fusionsassay entwickelt und angewendet werden, der die Quantifizierung des Verschmelzungszustandes der entsprechenden Membranleaflets und damit Aussagen über die Stabilität der Hemifusion zuläßt [Nüßler et al., 1997]. Die Hemifusion ist ein metastabiler Zustand, während dem aber die wäßrigen Kompartimente des Fusionssystems noch durch ein durch die inneren Membranlayer gebildetes "Diaphragma" getrennt bleiben. Ermöglicht wird dieser Zustand durch die Krümmungsneigung der einzelnen Membranlayer ("bending"). Chernomordik und Mitarbeiter postulieren die Bildung eines "lipid stalk", da Mizellen-formende Lipide (also positive Membrankrümmung verursachende Lipide, zum Beispiel Lysophosphatidylcholin (LPC)), wenn sie in die äußere Membranlayer eingebaut werden, die Fusion behindern. Lipide, die eine negative Membrankrümmung verursachen (zum Beispiel Oleinsäure), fördern die Fusion unter gleichen Umständen [Chernomordik et al., 1995a, 1995b, 1999]. Dadurch ließ sich ein weiteres (reversibles) Fusionsintermediat finden, der sogenannte "LPC-arrested stage", der im Fusionsgeschehen der pH-abhängigen Konformationsänderung des HA folgt aber noch vor dem bereits weiter oben beschriebenen "commitment"-Zustand des HA liegt (für eine kontroverse Diskussion siehe Günther-Ausborn et al. (1995) und Günther-Ausborn & Stegmann (1997)). Der Hemifusion (die sehr kurzlebig und eventuell "restricted" ist, was bedeutet, daß die Bewegung der Lipide über die Hemifusionsstelle behindert ist) folgt die Bildung einer frühen Pore mit einer Leitfähigkeit von 18-375 pS, was einer Porengröße von 1-2 nm entspricht [Spruce et al., 1989, 1991]. Solche frühen Poren können sich wiederholt öffnen und schließen ("flickering"), um sich schließlich irreversibel zu weiten. Dabei könnten mehrere kleine Poren zu einer größeren Pore verschmelzen. Die parallele Beobachtung des Lipidflusses und der Vermischung der wäßrigen Kompartimente zeigte, daß nach der elektrischen Leitfähigkeit zuerst der Lipidfluß und später das Fließen wasserlöslicher Zytoplasmamarker in Abhängigkeit von

ihrer Größe einsetzen [Tse et al., 1993; Zimmerberg et al., 1994; Blumenthal et al., 1996].

Ungeklärt bleibt bis jetzt die Frage, ob die erste frühe Pore eine reine Proteinpore ist (durchaus aus mehreren zusammengelagerten HA-Trimeren gebildet) [z.B. Almers, 1990; Tse et al., 1993] oder ob die Pore von Beginn an lipidisch ist und das HA mehr eine die Fusion katalysierende Wirkung hat [z.B. White, 1995; Chernomordik et al., 1999].

Unabhängig davon, ob HA die Fusion per se initiiert oder ob HA den Lipidfluß gewissermaßen “nur” katalysiert, auf jeden Fall stellt HA den Brückenschlag zwischen den zu fusionierenden Membranen her und vermittelt die Annäherung der Membranen. Die dreidimensionale Struktur der konformeren Zustände, die diese Funktion erfüllen, ist bis jetzt für noch kein vollständiges Fusionsprotein aufgeklärt. Ihre Kenntnis ist aber nicht nur Voraussetzung für Rückschlüsse auf die Funktion. Die Tatsache, daß bestimmte (Struktur-)Merkmale bei anderen -nicht nur viralen- Fusionsproteinen wiederkehren, könnte auf ein übergreifendes Prinzip in der Art einer universellen Struktur-Funktionsbeziehung für den Fusionsmechanismus hinweisen. Deshalb ist die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des HA eine vielversprechende und notwendige Aufgabe.

2. Zielstellung

Bei der Infektion einer Zelle fusioniert die Membran des Influenza-Virus mit der Membran der Wirtszelle und ermöglicht so die Freisetzung des viralen Genoms in das Innere der Wirtszelle. Diese Fusion wird durch eine (durch pH-Erniedrigung verursachte) Konformationsumwandlung der Ektodomäne des Glykoproteins Hämagglutinin (HA) ausgelöst. Zum Verständnis des Mechanismus, der eventuell ein Grundprinzip proteinvermittelter Fusionsprozesse überhaupt verkörpert, ist die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur der *vollständigen* Ektodomäne des HA während des Prozesses der Fusion nötig.

Durch Röntgenkristallographie konnten bisher die 3D-Struktur des HA eines Influenza-Stammes im nicht membranfusionsaktivierten Zustand sowie die 3D-Strukturen verschiedener HA-Fragmente unter Fusionsbedingungen aufgeklärt werden. Für letztere ist es schwierig, eine Interpretation für deren Relevanz zur Fusion vorzunehmen. Die Aufklärung der 3D-Struktur der vollständigen Ektodomäne unter Fusionsbedingungen ist bisher nicht gelungen.

Die vorliegende Arbeit soll prüfen, ob eine Aufklärung der 3D-Struktur des HA mittels 3D-Elektronenmikroskopie möglich ist. Es sollen der geeignete Influenza-Stamm und geeignete Untersuchungsbedingungen ermittelt werden und - wenn möglich - erstmals eine 3D-Struktur der vollständigen Ektodomäne des Influenza-HA, die einen fusionskompetenten (und keinesfalls bereits inaktivierten) Zustand repräsentiert, rekonstruiert werden.

3. Material und Methoden

3.1. Verwendete Lösungen und Chemikalien

Als Standardpuffer wurde PBS (phosphate buffered saline) pH 7,4 eingesetzt (150 mmol/l NaCl, 5,8 mmol/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$). Für alle Messungen bei pH-Werten $< \text{pH } 6$ wurde Natriumacetatpuffer verwendet (130 mmol/l NaCl, 20 mmol Natriumacetat). Um nach der Herstellung von LUV deren Quantifizierung durch eine Phosphatgehaltsbestimmung [Böttcher et al., 1961] zu ermöglichen, wurden die Lipide in HEPES-Puffer gelöst (5 mmol/l HEPES, 150 mmol/l NaCl).

Zur Zellzucht wurden folgende Medien verwendet:

- DMEM (+): - Dulbeccos modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco-BRL Life Technologies, Eggenstein) (mit L-Glutamin, mit 4.500 mg/l D-Glukose, ohne Na-Pyruvat)
- mit 100 units/ml Penicillin G (Na-Salz) (Biochrom KG, Berlin)
 - mit 100 µg/ml Streptomycinsulfat (Biochrom KG, Berlin)
 - mit 10% hitzeinaktiviertem fetalem Rinderserum (FBS) (Gibco-BRL Life Technologies, Eggenstein)
- DMEM (-): - wie DMEM (+), jedoch ohne FBS

Zum "liften" der Zellen wurde Trypsin (50 µg/ml) / EDTA (20 µg/ml) -Lösung (Biochrom KG, Berlin) benutzt.

Zur Aktivierung des expremierten HA0 und zur effizienten Bindung der Humanerythrozyten an die HA-expremierenden Zellen wurde Trypsin-Neuraminidase-Medium verwendet, bestehend aus DMEM (-) mit 5 µg/ml Trypsin (Biochrom KG, Berlin) und 0,22 mg/ml Neuraminidase.

Octadecylrhodamine B chloride (R18) wurde von Molecular Probes (Eugene, OR, USA) gekauft und in ethanolischer Stammlösung (1,75 mmol/l) bei -20°C lichtgeschützt aufbewahrt. 1,1'-bis(4-anilino)naphthalene-5,5'-disulfonsäure (bis-ANS) (ebenfalls von Molecular Probes

(Eugene, OR, USA)) wurde in methanolischer Stammlösung (1,3 mmol/l) bei 4°C gelagert.

3.2. Vermehrung von Influenzaviren

11 Tage alte befruchtete Hühnereier wurden mit Influenzavirus direkt in die Allantoishöhle beimpft (ID 50; 0,1 ml/Ei). Nach 48 Stunden Inkubation bei 37°C wurden diese über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend wurde deren Allantoisflüssigkeit auf Eis abgenommen und zur groben Reinigung zunächst 30 min mit 880 x g bei 4°C zentrifugiert. Danach wurden die Viren mit 100.000 x g für 90 min bei 4°C abzentrifugiert und mittels eines teflummantelten Homogenisators homogenisiert.

Die Aufbewahrung der Viren erfolgte bei -70°C in PBS + 0,2 Gew.% NaN₃. Die Proteinbestimmung wurde mit Hilfe des Proteinbestimmungskits (modifiziert nach Lowry, Rinderalbumin als Standard) der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen durchgeführt.

3.2. Reinigung von HA

Die Proteinmoleküle wurden für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen in rosettenförmige Assoziate überführt, um eine möglichst homogene statistische räumliche Orientierung der Moleküle zu ermöglichen. Influenzaviren wurden mit Hilfe von Detergenz (1,5% n-Octyl- β -D-glucopyranosid (OG), Alexis, Grünberg) durch 30minütiges sanftes Schütteln auf Eis solubilisiert und 60 min mit 100.000 x g in einem 70.1Ti Rotor (Beckman, München) bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels Affinitätschromatographie (Ricinaffinitätssäule (immobilisiertes Agglutinin RCA120 aus Ricinus Communis, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)) gereinigt. Das gebundene HA wurde mit Galactose als kompetitiven Zucker von der Säule eluiert. Das Eluat wurde fraktioniert und die proteinhaltigen Fraktionen vereinigt. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mittels Roti-Nanoquant (Carl Roth GmbH+Co., Karlsruhe). Gegebenenfalls wurde die Präparation mit Centricon 30 (Amicon, Beverly, MA, USA) aufkonzentriert. Nach Dialyse gegen PBS bzw. Natriumacetatpuffer liegt das HA in Rosetten assoziiert vor. Durch die Dauer der Dialyse bzw. nachträglichen Einbau bestimmter Lipide kann der Besetzungsgrad der Rosetten mit HA-Trimeren beeinflusst werden (siehe

Ergebnisteil).

3.4. Proteinase K Verdauung

Influenza wurde -bei jeweils angegebenen Temperaturen und niedrigen pH-Werten- inkubiert. Nach entsprechenden Zeiten wurde die Virussuspension durch Zugabe von 0,2 M NaOH reneutralisiert, mit Proteinase K (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) für 30 min bei 37°C, pH 7,4 verdaut und mit Trichloressigsäure gefällt. Danach wurde der Grad der Verdauung mittels SDS-PAGE analysiert.

3.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde (unter reduzierenden Bedingungen) unter Verwendung eines Minigel-Systems (58 cm) (Biorad, München) durchgeführt. Dazu wurden je 25 µl Probe und 5 µl Probenpuffer zusammengegeben und 3 min im Wasserbad gekocht. Pro Geltasche eines 12%igen Polyacrylamidgeles wurden jeweils 25 µl der entsprechenden Probenlösung gegeben. Die Färbung der Gele erfolgte mit Coomassie Brilliant Blau (Serva, Heidelberg). Die gefärbten Gele wurden noch vor dem Trocknen mit einem Flachbettscanner digitalisiert und mittels der Software SigmaScan/Image (SPSS, ehemals Jandel Scientific) ausgewertet.

3.6. Zucht von HA-exprimierenden Zellen

Die verwendete Zelllinie (GP4f) wurde uns freundlicherweise von Robert Blumenthal (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um Mausfibroblasten, die stabil HA0 von Influenza A/Japan exprimieren. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (T 75) (Nunc, Biochrom KG, Berlin) in einem Brutschrank in wasser-gesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ bei 37°C bebrütet. Zur Vermehrung ("Splitting") wurde das Medium (DMEM (+)) abgesaugt und die mindestens 80% konfluente Zellschicht mit Trypsin-EDTA-Lösung gewaschen. Nach Zugabe von 1,5 ml 37°C warmer Trypsin-EDTA-Lösung wurde die T 75-Flasche für maximal 10 min bei 37°C inkubiert. Nach Ablösung der Zellen (Kontrolle mit Lichtmikroskop) wurde die Trypsinaktivität durch Zugabe von 8,5 ml DMEM (+)

gestoppt. Die Zellen wurden verdünnt und in neue Flaschen ausgesät. Bei Benutzung von T 75-Zellkulturflaschen und bei einer Verdünnung von 1:10 (mit sorgfältiger Vermischung) benötigten die Zellen 3 Tage bis zur Konfluenz.

Zur längeren Lagerung wurden die Zellen 5 min mit 380 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 5 ml Gefriermedium (bestehend aus 80% v/v DMEM (+) + 10% v/v hitzeinaktivierten fetalem Rinderserum + 10% v/v DMSO (99,5 %)) resuspendiert, dann in 1 ml-Aliquotes auf 1,8 ml Kryo-Röhrchen aufgeteilt und für zwei bis drei Stunden bei -20°C, über Nacht bei -70°C und schließlich in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.7. Markierung von Viren mit Octadecylrhodamine B chloride (R18)

Nach dem Auftauen der Viren (Lagerung bei -70°C, Proteingehalt der Virussuspension 1 mg/ml) wurde R18-Stammlösung (Lagerung bei -20°C, Konzentration 2 mmol/l) im Verhältnis 1:200 zugegeben. Nach gründlicher Durchmischung wurde die Probe für 30 min bei Zimmertemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde nicht gebundener Label abzentrifugiert. Die Endkonzentration beträgt etwa 2 mol% des viralen Lipids.

3.8. Markierung von Humanerythrozyten mit R18

Frisches humanes Blut gesunder Spender (Blutspendezentrale des Universitätsklinikums "Charité", Berlin bzw. Blutbank des NIH, Bethesda, MD, USA) wurde zweimal mit etwa dem fünffachen Volumen von PBS 10 min bei 2.000 x g gewaschen. Das gewaschene Blut wurde mit PBS auf einen Hämatokrit von 5 eingestellt und 5 ml wurden mit 32 µl R18-Stammlösung (s.o.) unter ständigem Vortexen vermischt. Danach wurde der Ansatz mit DMEM (+) auf 50 ml aufgefüllt, in ein frisches Gefäß umgefüllt und erneut für 30 min bei Zimmertemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach Zentrifugation wurde mit PBS gewaschen (dabei erneut in ein frisches Gefäß umgefüllt) und in 5 ml PBS resuspendiert.

3.9. Bindung fluoreszenzmarkierter Erythrozyten an Zellen

Nach Ermittlung der Erythrozytenzahl durch Zählung in einer Thoma-Kammer wurde die Suspension der markierten Erythrozyten mit PBS auf eine Zellzahl von $5 \cdot 10^7$ eingestellt.

Die konfluente GP4f-Monolayer einer T 75-Zellkulturflasche (ca. $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml) wurde zweimal mit PBS gewaschen, dann wurde 5 ml Trypsin-Neuraminidase-Medium zugegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde durch Zugabe von 10 ml DMEM (+) die Trypsinaktivität gestoppt, erneut mit PBS gewaschen und die Erythrozyten-Suspension zugegeben. Nach 20minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz wurde die Bindung mit dem Mikroskop kontrolliert. Hatten die Erythrozyten gebunden, folgten sieben Waschungen mit PBS, um alle ungebundenen Erythrozyten zu entfernen. Danach wurden die Zellen mit 1 ml 37°C warmer Trypsin-EDTA-Lösung 5 min bei 37°C inkubiert und, nachdem sich die GP4f-Zellen vom Flaschenboden gelöst hatten, in 9 ml DMEM (+) resuspendiert. Nach Zentrifugation (1000/min, 5 min) wurde das Pellet in 100 µl PBS aufgenommen und bis zur Messung dunkel auf Eis aufbewahrt.

3.10. Herstellung offener Erythrozytenghosts

Zunächst wurde das Blut für 10 min bei 500 x g zentrifugiert und das Sediment zweimal mit etwa dem fünffachen Volumen von PBS 10 min bei 2.000 x g gewaschen. Im Anschluß daran wurden offene Erythrozytenghosts nach Dodge et al. (1963) präpariert. Dazu wurde das Sediment mit kaltem hypotonem Phosphatpuffer aufgefüllt und für 20 min bei 4°C inkubiert. Nach der auf diese Weise vollzogenen Hämolyse wurden die Ghosts durch 20minütige Zentrifugation (22.000 x g, 4°C) gesammelt, das Sediment wurde wieder mit kaltem hypotonem Phosphatpuffer aufgefüllt und erneut für 10 min bei 4°C inkubiert und anschließend 10 min zentrifugiert (4°C, 22.000 x g). Diese jeweils 10minütigen Inkubationen und Zentrifugationen wurden so oft wiederholt, bis der Überstand klar und das aus Ghosts bestehende Sediment weiß erschien. Abschließend erfolgte noch eine Waschung mit PBS (16.000 x g, 4°C). Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde mit dem Proteinkonzentrationsbestimmungskit der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde auf etwa 5 - 6 mg/ml mit PBS unter Zugabe von 2 Gew.% NaN_3 eingestellt. Die Erythrozytenghosts

wurden maximal für 3 Tage bei 4°C gelagert.

3.11. Herstellung von großen unilamellaren Vesikeln (LUV)

Zur Herstellung großer unilamellarer Vesikel (LUV) mit einem Durchmesser von ca. 100 nm wurde das Chloroform, in welchem die entsprechenden Lipide (alle von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) vorlagen, in einem Glasgefäß mittels Rotationsverdampfer abgedampft. Der so entstandene Lipidfilm wurde unter starkem Schütteln in HEPES-Puffer gelöst. Die Lipidsuspensionen wurden 5 Gefrier-Tau-Zyklen unterzogen. Dazu wurden die Suspensionen jeweils 15 min bei -75°C eingefroren und anschließend 10 min im Wasserbad bei 45°C aufgetaut. Danach wurden die Lipidsuspensionen zehnmal in einem Extruder (Lipex Biomembranes, Vancouver, Kanada), der mittels eines Thermostaten auf 45°C temperiert wurde, mittels Stickstoffüberdruck (40 bar) durch zwei übereinanderliegende Polycarbonatfilter (0,1 µm Porenweite, Nucleopore, Fa. Costar, Bodenheim) extrudiert. Die Größenkontrolle der Vesikel erfolgte durch Photonenkorrelationsspektroskopie (Coulter N4MD sub-micron particle analyzer, Beckmann Coulter Inc., Fullerton, USA).

3.12. Inaktivierung der Viren durch Vorinkubation bei niedrigem pH-Wert

500 µl Virus (1 mg/ml Protein) wurden wie beschrieben mit R18 markiert. Zur Zentrifugation wurden 50 µl der markierten Viren für die Kontrolle (keine Inaktivierung) entnommen, d.h. nach der Zentrifugation (9.000 x g, 5 min) wurde das Sediment mit PBS, pH 7,4 wieder auf 50 µl aufgefüllt. Das Sediment des restlichen Ansatzes markierter Viren wurden nach der Zentrifugation mit PBS niedrigen pH-Wertes (Temperatur und pH entsprechend dem Untersuchungsziel) auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt. Nach entsprechenden Zeiten wurden jeweils 50 µl entnommen und in ein Eppendorfgefäß mit 7,5 µl vorgelegter 0,05 N NaOH gegeben und sofort gründlich durchmischt, was zu einem Anstieg des pH-Wertes im Eppendorfgefäß auf etwa 7,4 führt. Damit wird in diesem Moment die Inaktivierung, die nur bei fusionsauslösendem pH-Wert abläuft (pH < 6,0), unterbrochen [Stegmann et al., 1986]. Bei parallel durchgeführter bis-ANS-

Messung der auf eben beschriebene Art teilweise inaktivierten Viren wurden dem Eppendorfgefäß jetzt 20 µl der Viren für diese Messung entnommen. Zu den verbleibenden 30 µl wurden 60 µl der wie beschrieben hergestellten Erythrozytenghosts gegeben und sofort gut vermischt. Dann wurden die Proben wie auch die Kontrollprobe für 30 min auf Eis gelagert.

3.13. R18-Fluoreszenzsondenassay

Zur Messung der Fusionsaktivität und -kinetik wurde der Fluoreszenzlabel Octadecylrhodamine B chloride (R18) nach Hoekstra et al. (1984) verwendet (Abbildung 5). Ist die Konzentration des Labels in der Membran hoch, kommt es zur Löschung des Fluoreszenzsignals durch Wechselwirkung der Rhodamingruppen untereinander (= "Selfquenching"). Bei Labelkonzentrationen bis 9 mol% ist dieses Selfquenching der Konzentration des eingebauten Labels direkt proportional [Hoekstra et al., 1984]. Die Fusion der R18-markierten Membran mit der Targetmembran führt zu einer zunehmenden Verdünnung des Fluorophors, damit zur Abnahme des Selfquenchings und zum Anstieg des meßbaren Fluoreszenzsignals. Diese Erhöhung des Fluoreszenzsignals wird nur durch den Fusionsvorgang verursacht, sie tritt weder nach virusinduzierter Aggregation bei niedrigen Temperaturen noch durch spontane Übertragung von R18 über das Lösungsmittel auf [Loyter et al., 1988].

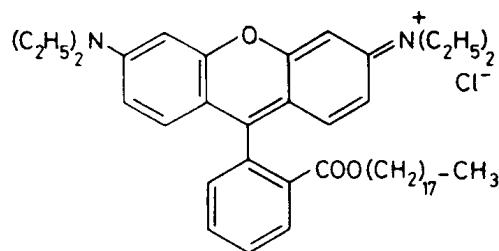


Abbildung 5

Octadecylrhodamine B chloride (R18)

Messung bei Verwendung von offenen Erythrozytenghosts als Targetzellen:

Zu den markierten Viren wurde das doppelte Volumen an Ghostsuspension gemischt und zum Binden der Viren an die Ghosts für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe bei $9.000 \times g$ für 5 min zentrifugiert, um nicht gebundene Viren abzutrennen.

Von der so präparierten Virus-Targetzellen-Suspension wurden 30 μ l in die Meßküvette mit 1970 μ l des jeweiligen vortemperierten Puffers (PBS oder Natriumacetatpuffer, pH-Einstellung mit CH_3COOH bzw. NaOH) durch Einspritzen überführt. Während der Messung wurde die Küvette temperiert und die Probe mittels Magnetrührer ständig gerührt. Die Messungen erfolgten an verschiedenen Fluoreszenzspektrometern der Firmen "Shimadzu", "Jasco", "Spex" und "SLM Aminco". Der Fluoreszenzlabel wurde mit einer Wellenlänge von 560 nm angeregt, die Emission wurde bei 590 nm gemessen. Im Emissionsstrahlengang befand sich zur Reduzierung des Streulichtes ein Kantenfilter.

Bei Verwendung von Humanerythrozyten als Targetzellen:

Zu den markierten Viren wurde die 10fache Menge an Erythrozytensuspension mit einem Hämatokrit von 1% gegeben. Dieses Gemisch wurde zum Binden der Viren 45 min auf Eis inkubiert und danach zweimal mit eiskaltem PBS durch kurzes Hochzentrifugieren auf $9000 \times g$ gewaschen. Danach wurde das Sediment in doppelt so viel Volumen PBS aufgenommen wie an Volumen der Virensuspension eingesetzt wurde.

Die Berechnung des Fluoreszenzdequenching (FDQ) erfolgte nach folgender Gleichung [Blumenthal, 1987] (siehe auch Abbildung 6):

$$FDQ [\%] = \frac{(F - F_0)}{(F_t - F_0)} * 100\%$$

F Intensität zur Zeit t

F_0 Intensität bei maximalem Selfquenching (Δ dem Plateauwert der Lag-Phase)

F_t maximal mögliche Fluoreszenzintensität (FDQ=100%) (experimentell durch Zugabe von

50 μ l 20%igem Triton X-100 erreicht, was eine vollständige Verdünnung des Labels bewirkt)

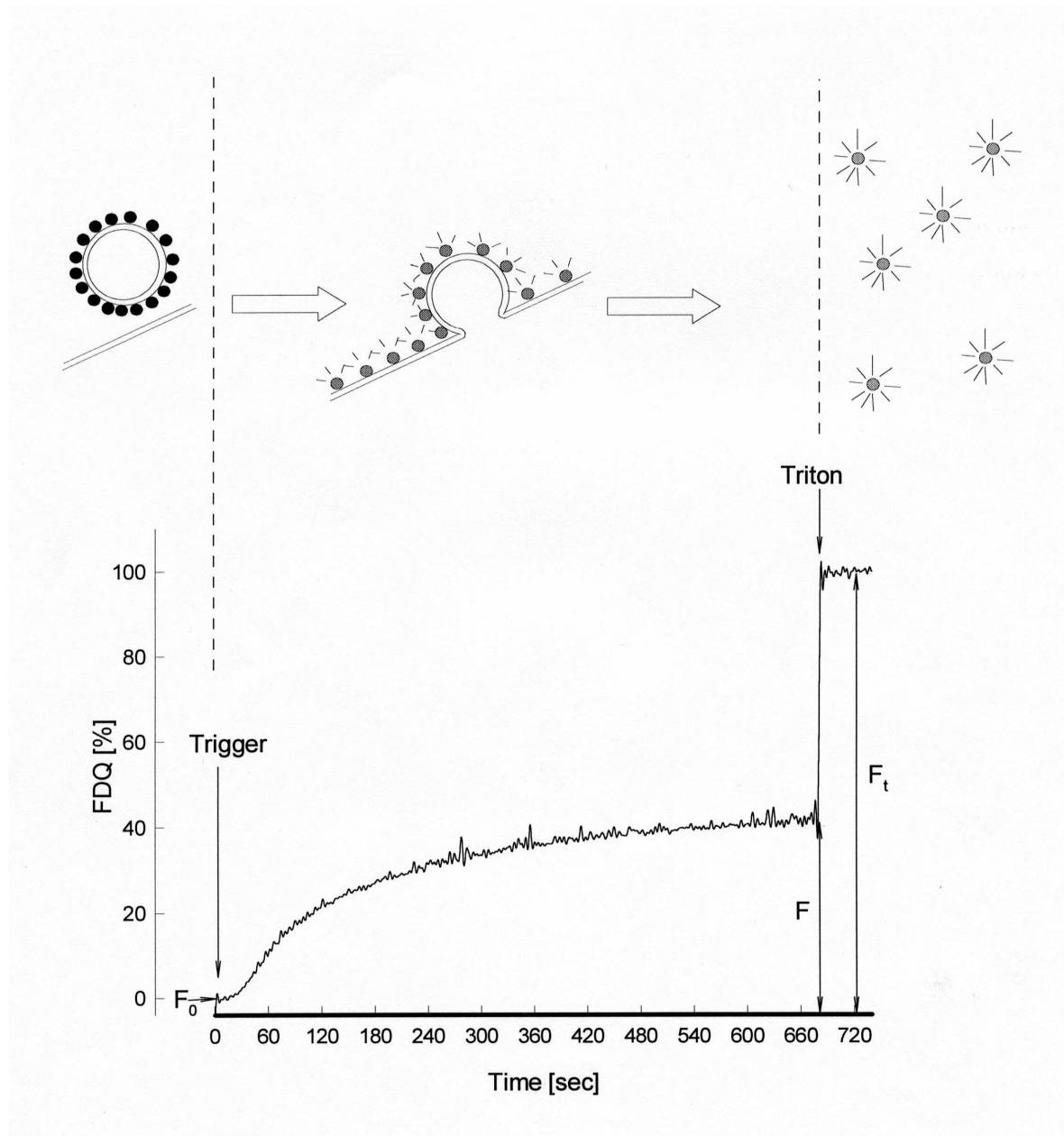


Abbildung 6 Schematische Darstellung des R18-Assays (als "Trigger" wirkt der saure pH-Wert des Puffers).

Abbildung 6 verdeutlicht die Zusammenhänge der verwendeten Größen.

Die Auswertung erfolgte mit den Programmen “TableCurve” und “SigmaPlot” der Firma SPSS (ehemals Jandel Scientific).

3.14. bis-ANS-Fluoreszenzsondenassay

Der Einsatz des Fluoreszenzmarkers bis-ANS (1,1'-bis(4-anilino)-naphthalen-5,5'-disulfonsäure) ermöglicht Aussagen über die Freilegung hydrophober Bindungsstellen und damit über den Grad der Konformationsumwandlung des HA.

Die Strukturformel ist in Abbildung 7 dargestellt.

Das Fluoreszenzverhalten von bis-ANS ist hinsichtlich Intensität und Lage des Emissionsspektrums stark von der Umgebung abhängig. Mit steigender Polarität des Lösungsmittels kommt es zu einer Rotverschiebung des Fluoreszenzmaximums und zum Absinken der Quantenausbeute. Dementsprechend ist die Quantenausbeute in wässriger Lösung sehr gering, das Fluoreszenzmaximum liegt dann bei 555 nm. Die Absorptionsmaxima liegen bei 270 nm und 400 nm [Slavik, 1982].

Bis-ANS bindet nichtkovalent an hydrophobe Bindungsstellen (Lipide und Proteine), was zur Abnahme der Polarität der Umgebung und damit zu einer Erhöhung des Fluoreszenzsignals führt. Dabei ist der Fluoreszenzanstieg proportional zur Anzahl der gebundenen bis-ANS-Moleküle [Rosen & Weber, 1969].

Bindungsstellen mit höherer Affinität verursachen auch eine höhere Quantenausbeute, proteingebundenes bis-ANS fluoresziert bei niedrigeren Wellenlängen als lipidgebundenes (460-500 nm).

Eine Beeinflussung der bis-ANS-Fluoreszenz durch den pH-Wert ist nicht bekannt.

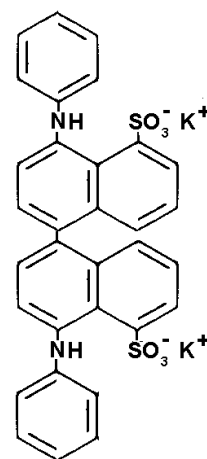


Abbildung 7 bis-ANS

Wie Korte (1991) zeigen konnte, beeinflussen sich die Fluoreszenzlabel R18 und bis-ANS untereinander nicht, so daß zur Messung R18-vormarkierte Viren verwendet werden können. 20 µl der Viren wurden mit 40 µl PBS, pH 7,4 vermischt und zu 2 ml vortemperiertem Puffer in der Meßküvette gegeben, die außerdem 5 µl bis-ANS-Stammlösung (1,3 mM) enthielt. Die Messung erfolgte an einem Shimadzu-Fluoreszenzspektrometer RF 5000 mit angeschlossenem Personalcomputer. Der Inhalt der Meßküvette wurde ständig gerührt, die Küvette während der gesamten Messung temperiert. Die Anregungswellenlänge betrug 400 nm, die Emissionswellenlänge 490 nm.

Zunächst wurde der Wert für die bis-ANS-Grundfluoreszenz gemessen, danach erfolgten die Messungen für den Fluoreszenzanstieg bis zu einem Plateauwert. Dann wurden 50 µl 20 %iges Triton X-100 zugegeben und nach 2 min die Tritonwerte für bis-ANS und R18 gemessen.

Der Wert für die relative Fluoreszenzintensität F_{rel} wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$F_{rel} = \frac{(F - F_0)}{F_t} * 100$$

F Intensität zum Zeitpunkt t

F_0 bis-ANS-Grundfluoreszenz vor Viruszugabe

F_t R18-Tritonwert zur Normierung der bis-ANS-Fluoreszenz auf die Viruskonzentration

3.15. Präparation für die Elektronenmikroskopie

Die Rosetten aus HA Trimeren wurden 1:10 mit PBS (pH 7,4) oder mit Natriumacetatpuffer (pH 5,0) verdünnt und für 10 min bei 4°C oder 37°C inkubiert. Die Probenlösung wurde auf Elektronenmikroskopie-Grids aus Kupfer (400 Maschen) aufgetragen, die zuvor mit einer Kohlelochfolie beschichtet und zur Hydrophilisierung in Vakuum beglimmt (60 s bei 8 W mittels einer BALTEC MED 020) wurden. Überschüssiges Material wurde abgeplottet und vor der Kryofixierung wurde Kontrastmittel (1 % PTA (Phospho-Tungstic-Acid), pH 7,4) zugesetzt, so daß kontrastreiche Aufnahmen relativ nahe am Fokus und damit in guter Auflösung erhalten werden konnten (Schema der Präparation in Abbildung 8). Die Zugabe von Schwermetallsalzen

vor der Kryofixierung störte die Struktur auf dem erreichten Auflösungslevel nicht, wie der Vergleich mit der bekannten Röntgenstruktur von Influenza X31 [Wilson et al., 1981] zeigen sollte (siehe Ergebnisse und Diskussion). Danach wurde die Probe -analog zu der in der Kryo-Elektronenmikroskopie üblichen Probenpräparation- sofort vitrifiziert durch schnelles Eintauchen in flüssiges Ethan. Die Proben waren damit in eine Matrix vitrifizierten Eises eingebettet, die eine Austrocknung verhinderte. Durch die unterstützende Kontrastierung konnten die HA-Trimere aber auch unter Aufnahmebedingungen dicht am Fokus noch auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen lokalisiert werden.

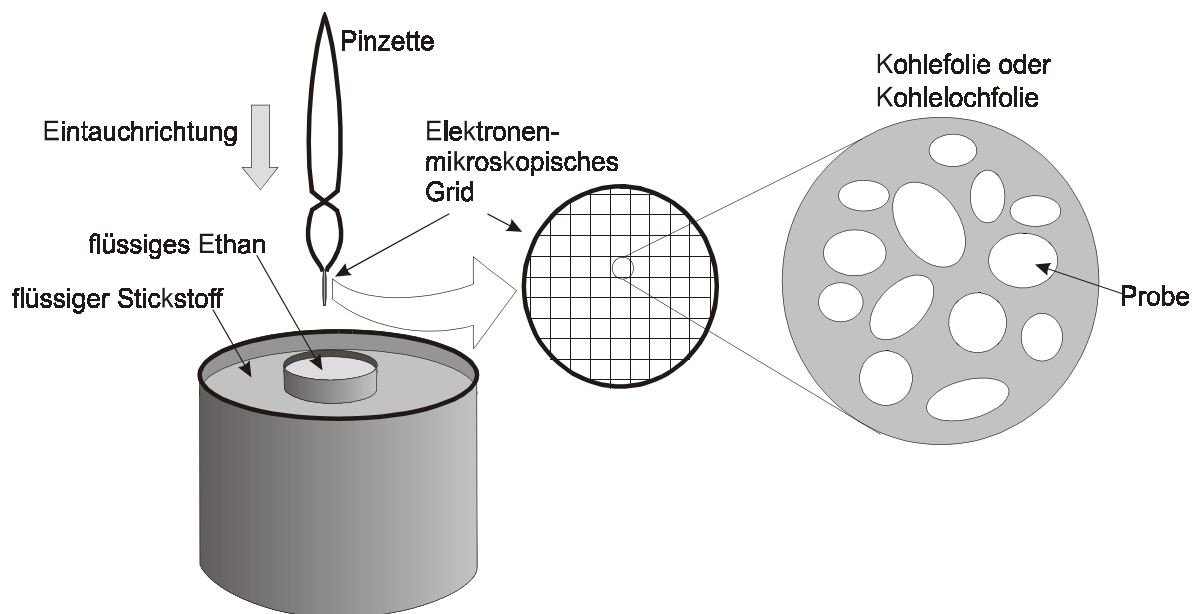


Abbildung 8

Probenpräparation für die Elektronenmikroskopie
(Abbildung modifiziert nach Stark, 1996)

3.16. Elektronenmikroskopie

Die Proben wurden mit einem Kryo-Halter und Transfersystem (Model 626 der Fa. Gatan) in ein Transmissionselektronenmikroskop "CM12" der Firma Philips überführt und unter "low-dose"-Bedingungen bei $-174\text{ }^{\circ}\text{C}$ und unter Verwendung einer gewöhnlichen Wolfram-Haarnadelkathode mikroskopiert, mit einer Primär-Vergrößerung von 58.300 x und einem Defokus, der einem ersten Nulldurchgang der Phasenkontrastübertragungsfunktion bei $\sim 8.5\text{ }\text{\AA}$ (neutraler pH) bzw. $\sim 12\text{ }\text{\AA}$ (niedriger pH) entspricht.

3.17. Digitalisierung der elektronenmikroskopischen Negative

Durch Untersuchung der elektronenmikroskopischen Negative im Laser (optische Diffraction) wurden stark defokussierte oder astigmatische Aufnahmen entfernt. Die verbleibenden Negative wurden digitalisiert. Dafür wurde ein linearer CCD-Scanner verwendet ("EmiL", ImageScience Berlin), ausgestattet mit Durchlichteinheit, CCD-Kamera (maximal 5.000×7.000 Pixel) und ApoRodagon-Optik (Optische Werke G. Rodenstock, München).

3.18. Rechnergestützte Bildverarbeitung nach der Einzelpartikelmethode

Zur rechnergestützten Bildverarbeitung nach der Einzelpartikelmethode und zur 3D-Rekonstruktion der elektronen-mikroskopischen Daten wurde das Softwarepaket "IMAGIC-5" der Firma Image Science Software GmbH, Berlin, verwendet. Durch die fortschreitende Entwicklung der Rechentechnik konnte der (anfangs nur auf teuren sogenannten "workstations" (SUN und DEC-alpha) ausführbare) Bildverarbeitungsprozeß gegen Ende auf zwei handelsüblichen Personalcomputern mit Intel-CPU's ("Pentium Pro 200" bzw. zwei "Pentium II 450" auf einem Dualboard) durchgeführt werden. Als Betriebssystem wurde "Linux" ("Red Hat-Distribution") verwendet. Der Arbeitsspeicher der PC (128 bzw 256 MB) war ausreichend, um die meisten Berechnungen "in core" ausführen zu können (d.h. das gesamte Bild wird in den RAM des Computer übernommen).

4. Grundlagen der Bildverarbeitung:

Einzelpartikelmethode und 3D-Rekonstruktion

Bei der Verwendung von Elektronen anstelle von Licht für ein abbildendes System stehen dem Vorteil der kürzeren Wellenlänge (und damit der höheren theoretischen Auflösung von $\delta \approx 0.2$ nm gegenüber $\delta \approx 200$ nm bei der Lichtmikroskopie) eine Reihe von Nachteilen gegenüber. Die für die Elektronenmikroskopie von biologischen Objekten entscheidendsten sind zum einen die Notwendigkeit, das Präparat in Vakuum zu überführen, zum anderen die Empfindlichkeit biologischer Objekte gegenüber der Elektronenstrahlung. Die Gefahr der Austrocknung der Teilchen konnte durch die Technik der Eiseinbettung weitgehend reduziert werden, wie Vergleiche mit anderen Techniken der Strukturaufklärung im Rahmen der erzielten Auflösungen zeigen konnten. Es ist u.a. auch ein Anliegen der vorliegenden Arbeit, die diesbezügliche Eignung der Methode (insbesondere auch der Präparationstechnik) zur Strukturuntersuchung biologischer Makromoleküle zu untermauern.

Das Problem der Strahlenschädigung der Probe bleibt aber bestehen. Zwar werden auch die Strahlenschäden mit abnehmender Präparattemperatur geringer (der sogenannte "Kryo-protektionsfaktor" steigt an), trotzdem bleiben biologische Proben sehr empfindlich gegenüber der Elektronenstrahlung. Die Situation ist vergleichbar mit der fotografischen Aufnahme eines lichtempfindlichen Objektes in einem relativ dunklen Raum. Der Einsatz eines Blitzlichtes würde ein gutes und kontrastreiches Bild des zerstörten Objektes liefern, ohne Blitz erhält man ein stark unterbelichtetes Bild des intakten Objektes.

Da die Aufnahme eines (strahlen-)geschädigten Objektes wenig hilfreich ist, wird man den zweiten Weg gehen. Allerdings ist das Rauschen in solch unterbelichteten Bildern bis zu drei Größenordnungen größer als das Signal (Signal-Rauschverhältnis $S^2/N^2 = 0,001$). Verfügt man allerdings über n Bilder mit der gleichen Bildinformation und addiert diese auf, verbessert sich das Verhältnis S^2/N^2 um den Faktor n . Das ist der Ansatz der Bildverarbeitung in der Elektronenmikroskopie: Bildmittelung führt zu einer Reduzierung des stochastischen Rauschens und damit zu einer Verschiebung der Auflösung in Richtung theoretische (instrumentelle)

Auflösungsgrenze des Elektronenmikroskops.

4.1. Filterung und Normierung

Um die Bilder von Einzelpartikeln zur Verbesserung des Signal-Rauschverhältnisses mitteln (also addieren) zu können, müssen gleiche Bilder exakt gleich ausgerichtet werden. Der erste dazu notwendige Schritt ist die Filterung der Einzelbilder. Die Filterung läßt sich am besten im Fourier-Raum durchführen. Die Darstellung eines Bildes im Fourier-Raum ist äquivalent der im Real-Raum, beide enthalten die exakt gleiche Information! Auf die in den Fourier-Raum transformierten Bilder wird ein “band-pass filter” angewendet, ein Produkt aus Gaußschem Hoch- und Tiefpaß [van Heel & Stöffler-Meilicke, 1985]. Niedrige Ortsfrequenzen, die ungleichmäßige Objektbeleuchtung oder die Verteilung des Kontrastmittels repräsentieren und sehr hohe Ortsfrequenzen, die nur noch das Rauschen beschreiben, werden auf diese Weise entfernt. Die Wahl der Filterparameter muß mit Sorgfalt erfolgen. Werden “zu viele” niedrige Ortsfrequenzen abgeschnitten, also der Schwellenwert zu hoch gelegt, wird die exakte Ausrichtung der Bilder erschwert, werden “zu viele” hohe Ortsfrequenzen abgeschnitten, d.h. der Schwellenwert wird zu niedrig gelegt, verliert man feine Strukturdetails und damit Auflösung.

Um möglichst viel Hintergrund zu entfernen, der keine Bildinformation enthält, werden die Einzelbilder nach der Filterung mit einer Kreismaske umgeben, außerhalb derer die Helligkeitswerte auf Null gesetzt werden. Da die Einzelbilder eines Datensatzes nicht nur aus unterschiedlich ausgeleuchteten Stellen des Negatives sondern auch aus verschiedenen Negativen stammen können, werden deren Helligkeiten normiert, d.h. innerhalb der Kreismaske wird die durchschnittliche Helligkeit Null und die Varianz auf einen einheitlichen Wert gesetzt.

4.2. Ausrichtung

Um das Signal-Rausch-Verhältnis in den Bildern durch Aufsummieren zu verbessern, müssen die Bilder nicht nur die gleiche Information enthalten, sondern letztere muß auch an exakt der gleichen Stelle liegen. Dazu müssen die Einzelbilder zueinander ausgerichtet werden. Wichtigste Voraussetzung ist dabei ein homogener Datensatz, die Teilchen sind also im weitesten Sinne

isomorph.

Betrachtet man die zu mikroskopierenden Teilchen in Lösung als freie starre Körper, so haben sie drei Translations-Freiheitsgrade und drei Rotations-Freiheitsgrade. Transmissions-elektronenmikroskopische Bilder sind Projektionsbilder mit einer 90° zum Elektronenstrahl orientierten Projektionsfläche (siehe unten, "Ermittlung der Eulerwinkel"), die Position in Richtung der Applikatachse ("z") ist damit in erster Näherung irrelevant. Für eine Ausrichtung verbleiben also zunächst die notwendige Verschiebung in x- bzw. y-Richtung und die Drehung α innerhalb der Projektionsfläche. Abbildung 9 soll am Modell eines Glas-Stopfens das Vorgehen veranschaulichen: Als Modell für Projektionsbilder sollen Aufnahmen eines (transparenten) Stopfens auf einem Leuchttisch dienen. Zunächst muß eine Referenz vorliegen (erste Spalte in Abbildung 9), an der die zu mittelnden Bilder ausgerichtet werden. (Für die Findung einer ersten Referenz in unserem Falle siehe Ergebnisteil, für das Prinzip einer "reference-free alignment"-Technik siehe Schatz und van Heel (1990).) Die in Zeile A dargestellte Konstellation soll noch einmal verdeutlichen, das ein homogener Datensatz erforderlich ist. Die Ausrichtung heterogener Objekte zum Zwecke der Mittelung ist *a priori* unsinnig und führt natürlich nicht zu einer Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses. Zeile B veranschaulicht die Translation ("x, y"), Zeile C die Rotation (" α ") in der Bildebene.

Für die Translation werden Referenzbild und zu verschiebendes Bild fourier-transformiert. (Die Darstellungen im Fourierraum enthalten die gleiche Information wie die im Bildraum.) Danach werden beide Bilder komplex miteinander multipliziert und das Produkt in den Bildraum zurücktransformiert. Abbildung 10 zeigt dieses Vorgehen am Beispiel einer Projektion entlang der Längsachse des Glas-Stopfens aus Abbildung 9. In Zeile A ist die Referenz mit dem auszurichtenden Bild identisch, das Produkt entspricht der sogenannten Autokorrelation des Bildes, mit einem scharfen Maximum genau in der Bildmitte. In Zeile B ist das auszurichtende Bild (welches das gleiche Motiv enthält) gegenüber der Referenz um jeweils einen bestimmten Betrag in x- und y-Richtung verschoben.

Das Produkt entspricht jetzt der sogenannten Kreuzkorrelationsfunktion ("cross-correlation function", CCF), deren Maximum ist exakt um die gleichen Werte x und y verschoben wie das auszurichtende Bild gegenüber der Referenz. Es muß also der höchste Helligkeitswert im CCF-

Bild gefunden werden und das auszurichtende Bild um die Werte $-x$ bzw. $-y$ verschoben werden. Die Korrelation zwischen dem auszurichtenden Bild und der Referenz ergibt sich aus der Höhe des Maximums [Frank 1980].

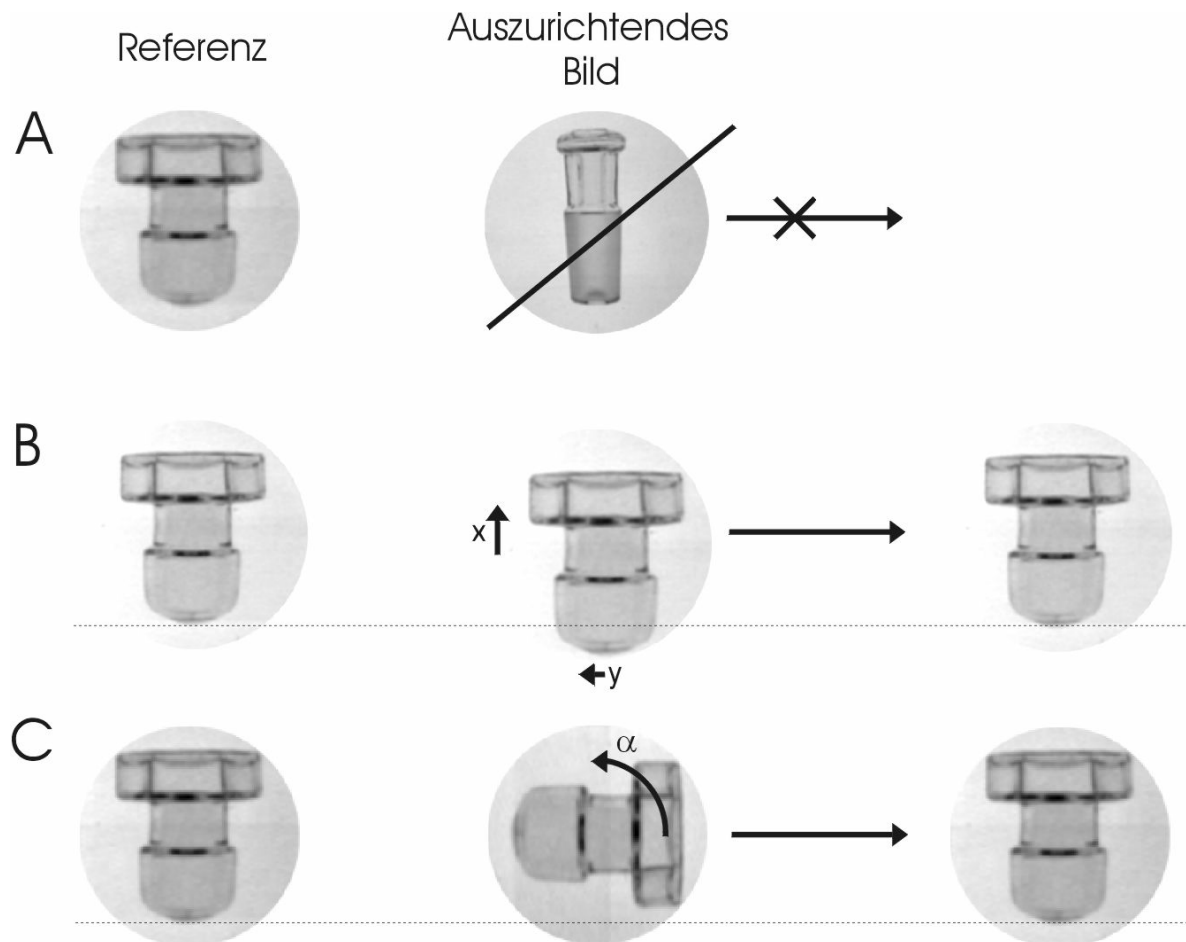


Abbildung 9 Ausrichtung an einer Referenz, A: Der Datensatz muß homogen sein, eine Ausrichtung heterogener Objekte zueinander zum Zwecke der späteren Mittelung ist a priori unsinnig, B: Translation in der Bildebene (" x " und " y "), C: Rotation in der Bildebene (" α ")

Die Rotationsausrichtung des Bildes verläuft ähnlich, nur werden Bild und Referenz in Kreiskoordinatenbilder umgewandelt und fouriertransformiert. Deren Multiplikation ergibt (analog zur CCF) die Drehkorrelationsfunktion ("rotational-correlation-function", RCF). Wieder

liefert das Maximum (also der höchste Helligkeitswert) den Drehwinkel " α ", um den das Bild bezüglich der Referenz zu drehen ist. Allerdings muß das zu rotierende Teilchen möglichst zentriert sein, eine vorherige Zentrierung (also die Verschiebung in x- und y-Richtung) setzt jedoch die weitgehende Übereinstimmung der Rotationsorientierung in der Projektionsebene (also " α ") voraus [Steinkilberg & Schramm, 1980]. Diesem Problem kann man jedoch in praxi mit der iterativen Durchführung beider Ausrichtungsverfahren begegnen.

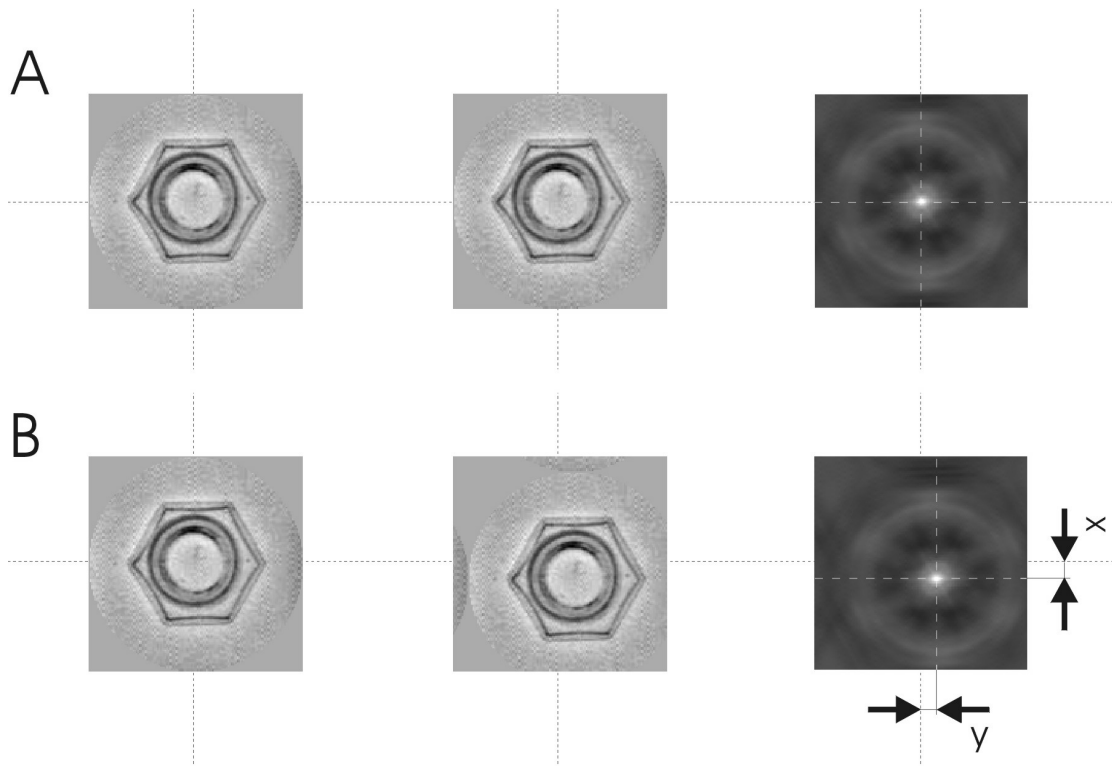


Abbildung 10 Bestimmung der Transversalverschiebung: Wird die Fouriertransformierte eines Bildes mit sich selbst komplex multipliziert und in den realen Raum zurücktransformiert, erhält man die Kreuzkorrelation mit sich selbst (Autokorrelation) mit einem scharfen Maximum genau in der Bildmitte (A). Ist das Bild bezüglich der Referenz verschoben, ist das Maximum des Kreuzkorrelationsbildes um den gleichen Verschiebungsvektor verschoben und kann leicht ermittelt werden.

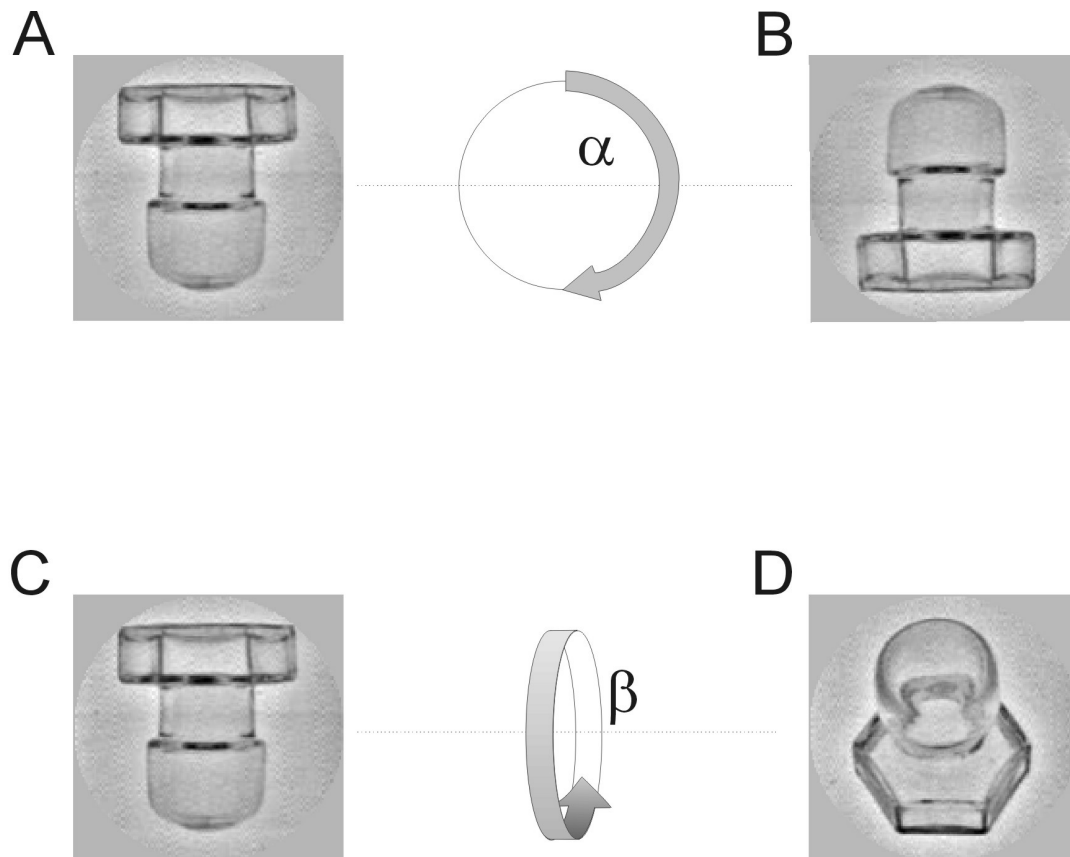


Abbildung 11

Da TEM-Bilder Projektionsbilder sind, ist die Position in z-Richtung in erster Näherung irrelevant. Bilder, die sich in den verbleibenden Translations-Freiheitsgraden x bzw. y oder im (“in-plane-”) Rotations-Freiheitsgrad α unterscheiden, können zueinander ausgerichtet werden (A, B).

Unterscheiden sich die Teilchen hinsichtlich der “out-of-plane”-Rotation um die x - bzw. y -Achse, entstehen neue Projektionen; es wird eine Klassifizierung erforderlich, um Angehörige der gleichen charakteristischen Projektionen zusammenfassen zu können (C, D).

4.3. Klassifizierung

Nach der oben beschriebenen Ausrichtung verbleiben von den ursprünglich drei Translations-Freiheitsgraden und den drei Rotations-Freiheitsgraden noch zwei der Rotations-Freiheitsgrade, welche die Rotation um die x- bzw. z-Achse “aus der Bildebene heraus” beschreiben (“ β ” und “ γ ”). Unterscheiden sich die Teilchen in diesen zwei Rotations-Freiheitsgraden, entstehen verschiedene Projektionen (siehe Abbildung 11). Eine Translation bzw. Rotation in der Bildebene (Abbildung 9 B bzw. C) reicht dann nicht mehr aus, um die Teilchen zum Zwecke der Bildmittelung aufaddieren zu können. Gelingt es aber, die Teilchen eines Datensatzes den vorkommenden charakteristischen Projektionen dieses Datensatzes entsprechend zuzuordnen, also zu “klassifizieren”, können diese wie oben beschrieben ausgerichtet und schließlich gemittelt werden.

Für eine Einzelbildgröße von 80 x 80 Pixeln müßten bei der Größe unserer verwendeten Datensätze allerdings ca. 4 bis $10 \cdot 10^{10}$ Bildpunkte verglichen werden, was beim derzeitigen Entwicklungsstand der EDV nicht in einem angemessenen Zeitrahmen zu bewerkstelligen wäre. Deshalb ist der erste notwendige Schritt der Klassifizierung die Datenreduktion per

“Multivariater Statistischer Analyse” (MSA).

Die multivariate Statistik [Lebart et al., 1984] ist eine mathematische Eigenwert-Eigenvektor Analyse, die seit ihrer Einführung in die Bildverarbeitung durch van Heel und Frank im Jahre 1981 integraler Bestandteil vieler Bildbearbeitungsverfahren ist.

Die Bilder werden mit einer Farbtiefe von 8 bit ($2^8=256$) digitalisiert, d.h. jeder der p Bildpunkte eines Bildes wird durch einen bestimmten Grau- bzw. Helligkeitswert von 0 (=schwarz) bis 255 (=weiß) repräsentiert. Spannt man ein p-dimensionales Koordinatensystem (“MSA-Hyperraum”) auf, in dem jede Achse den Helligkeitswert in einem der p Bildpunkte beschreibt, wird jedes Bild durch einen Punkt im MSA-Hyperraum definiert. Abbildung 12 soll dies für den Fall von Bildern, die nur aus drei “Bildpunkten” (den Quadranten x, y und z) bestehen, veranschaulichen.

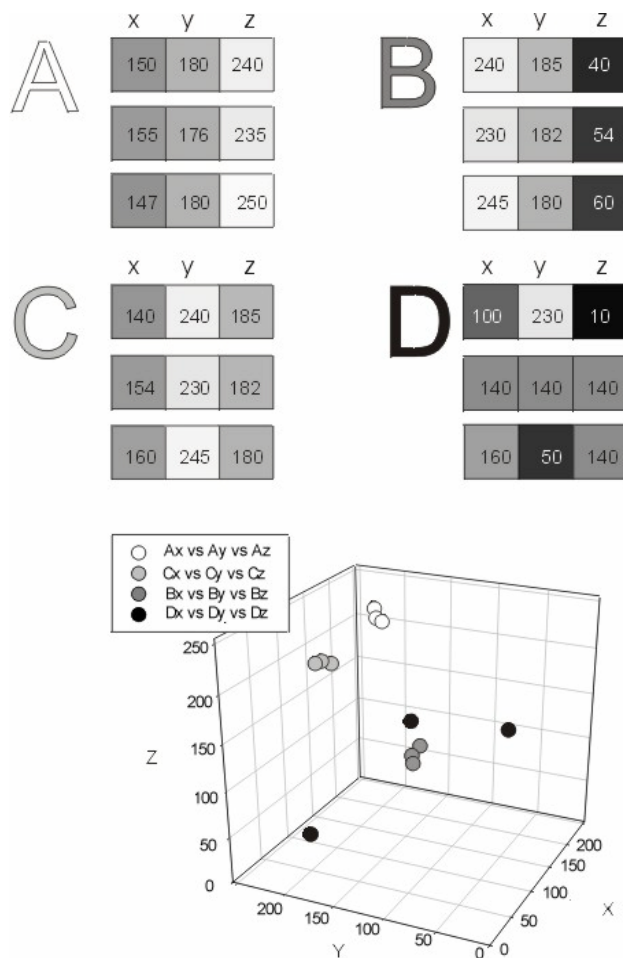


Abbildung 12

Für Bilder, die nur aus den drei Bildpunkten x, y und z (durch die Quadrate dargestellt) bestehen, wäre der “MSA-Hyperraum” nur dreidimensional. Die drei “Bilder” in Gruppe A zeigen ein ähnliches “Motiv”, dies gilt auch jeweils für die “Bilder” der Gruppe B und C. Die drei “Bilder” der Gruppe D enthalten eine stark unterschiedliche Information. Trägt man für jedes Bild den Helligkeitswert eines jeden Bildpunktes (entspricht der Zahl in jedem Quadrat) auf seiner zugehörigen Achse ab, ist jedes Bild eindeutig als Punkt definiert. Bilder mit gleicher Information liegen dicht beieinander (A, B, C), Bilder mit unterschiedlicher Information sind dagegen weit voneinander entfernt (D).

Dreimal enthalten jeweils drei solcher “Bilder” eine ähnliche Information, würden also die annähernd gleiche Projektion repräsentieren. In dem dreidimensionalen Koordinatensystem, in dem die Helligkeiten der “Bildpunkte” x , y und z an den entsprechenden Achsen abgetragen wurden, befinden sich diese Bilder (A, weiß; B, dunkelgrau und C, hellgrau) in enger Nachbarschaft. Bei identischer Information (das entspräche in der Praxis dem irrealen Fall von Abbildungen exakt gleicher Teilchen, die perfekt ausgerichtet und völlig rauschfrei in der gleichen Projektionsrichtung aufgenommen sind) würden die Bilder an exakt demselben Punkt liegen. Wegen des in praxi auftretenden Rauschens bilden Bilder, die die gleiche Projektion des Teilchens zeigen, sogenannte Unterwolken im MSA-Hyperraum. Die drei “Bilder” der Gruppe D (schwarz) - mit offensichtlich unterschiedlicher Information - sind dagegen weit voneinander entfernt.

Um nun die notwendige Datenreduktion zu erreichen, wird das p -dimensionale Koordinatensystem so gedreht, daß es der Form der Datenwolke optimal angepaßt ist. Dazu soll die erste Achse in Richtung der größten Varianz des Datensatzes weisen, die nächste orthogonale Achse in Richtung der verbliebenen größten Varianz usw. Dadurch können mit einigen wenigen Achsen die Hauptunterschiede der Bilder im Datensatz beschrieben werden. (Für die mathematische Beschreibung dieser Anpassung der Koordinatenachsen an die dem Datensatz innewohnende Information (Eigenwert-Eigenvektor-Problem) siehe z.B. van Heel et al., 1992.) Nach der auf diese Weise erfolgten Datenreduktion kann die eigentliche Klassifizierung erfolgen. Dabei sollen die im MSA-Hyperraum eng benachbarten Bilder zu Klassen zusammengefaßt werden, denn diese repräsentieren ja jeweils eine charakteristische Projektion. Das bedeutet, die sogenannte Intra-Klassen-Varianz soll minimal werden. Gleichzeitig sollen die Abstände zwischen den verschiedenen Klassen (Inter-Klassen-Varianz) maximal werden. Dazu wurde eine hierarchisch aufsteigende Klassifizierung benutzt. Dabei wird mit einer Klassenanzahl begonnen, die der Anzahl der Einzelbilder im Datensatz entspricht (d.h. pro Klasse ein Bild). Danach werden zwei Klassen immer nur dann zusammengeführt, wenn die durch diese Vereinigung bedingte Zunahme der totalen Intra-Klassen-Varianz auf dieser Stufe so klein wie möglich ist. Diese Zusammenfassungen werden bis zu einer Vereinigungsstufe fortgesetzt, die der gewünschten (angegebenen) Klassenanzahl entspricht. (Es existiert leider

kein Algorithmus, der in der Lage wäre, die Anzahl der Klassen in einem Datensatz automatisch zu bestimmen.) Da ein Bild, das einmal einer bestimmten Klasse zugeordnet wurde, diese im Verlauf der Klassifizierung nicht mehr verlassen kann, wird ein sogenanntes “moving-elements-refinement” nachgeordnet. Dabei wird jedes Bild nochmals aus seiner Klasse herausgenommen und die “addierte” Intra-Klassen-Varianz zu jeder anderen Klasse berechnet. Paßt das Bild besser in eine andere Klasse, d.h. die Intra-Klassen-Varianz ist kleiner, werden alle Intra-Klassen-Varianzen neu berechnet. Dies wird für alle Bilder durchgeführt. Da sich dabei die Klassen verändern, wird das Verfahren solange iterativ durchgeführt, bis sich die Klasseneinteilung festigt [van Heel, 1984; van Heel, 1989].

4.4. Bildmittelung

Da die Teilchen durch die Klassifizierung gleichen charakteristischen Projektionen zugeordnet wurden, d.h. alle Bilder einer Klasse enthalten näherungsweise die gleiche Bildinformation, können sie jetzt durch Summierung gemittelt werden. Da das Rauschen statistisch verteilt ist, nimmt dabei die Bildinformation rasch zu.

Da am Beginn der Ausrichtung der Einzelbilder eines Datensatzes noch keine guten Referenzen vorliegen (eine mögliche erste Referenz wäre zum Beispiel die Summe aus mehreren ausgewählten “typischen” Einzelbildern), können diese Klassensummen nun wieder als (wesentlich verbesserte) Referenzen zur Ausrichtung des Datensatzes dienen. Diese Ausrichtung an mehreren Referenzen wird als “Multi-Reference-Alignement” (MRA) bezeichnet [van Heel & Stöffler-Meilicke, 1985]. Dabei erfolgt die Ausrichtung nur an der Referenz, die den höchsten Korrelationskoeffizienten mit dem auszurichtenden Bild aufweist. Danach kann man - über MSA und erneute Klassifizierung - wiederum verbesserte Klassensummen erhalten, die ihrerseits wieder als neue Referenzen dienen können. Das Verfahren kann solange fortgesetzt werden, bis die Klassensummen stabil sind.

4.5. Ermittlung der Eulerwinkel

Die durch die Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) erzeugten Bilder liefern keine Oberflächenansichten der zu untersuchenden Objekte, vielmehr ist jeder Bildpunkt das Ergebnis

einer Mittelung der Elektronendichte des aufgenommenen Objektes in Richtung des Elektronenstrahls. TEM-Bilder sind also Projektionsbilder, die immer auch Rauminformation beinhalten. Modellhaft soll dies in Abbildung 13, erneut am Beispiel des Glas-Stopfens, dargestellt werden. Die Pfeile geben fünf verschiedene Projektionsrichtungen an, auf den Projektionsflächen erscheint das entsprechende Projektionsbild. Die Ansicht “von oben” enthält beispielsweise die gleiche Information wie die Ansicht “von unten” (bei Oberflächenansichten, wie sie die Fotografie liefert, wären die beiden Ansichten verschieden und würden auch keine Rauminformation des Objektes liefern).

Durch die oben beschriebenen Bildverarbeitungsschritte sollten inzwischen gute (d.h. relativ rauschfreie) zweidimensionale Projektionen der 3D-Struktur in verschiedenen Projektionsrichtungen vorliegen. Um aus diesen 2D-Projektionen eine dreidimensionale Rekonstruktion berechnen zu können, muß deren relative räumliche Orientierung zueinander bekannt sein. Diese wird durch die drei “Euler-Winkel” eindeutig beschrieben (Abbildung 14). Die Größe der Eulerwinkel kann durch die Technik des “angular reconstitution” [van Heel, 1987] gefunden werden. Das Verfahren beruht auf dem “common line projection theorem” [van Heel, 1987], welches besagt, daß zwei 2D-Projektionen eines 3D-Objektes wenigstens eine eindimensionale Projektion im Bildraum gemeinsam haben.

Wie Projektionen eines 3D-Objektes in verschiedene Winkel zweidimensionale Bilder erzeugen, können aus einem zweidimensionalen (Projektions-)bild durch Projektionen (entlang der Bildebene) eindimensionale Bilder (also Linien) erzeugt werden. Zur Berechnung einer solchen 1D-Linien-Projektion werden alle Dichten eines 2D-Objektes in einer Richtung innerhalb der Bildebene aufsummiert. Es entsteht eine ein Pixel starke Linie mit Pixeln unterschiedlicher Helligkeit, also eine 1D-Linien-Projektion (siehe Abbildung 15).

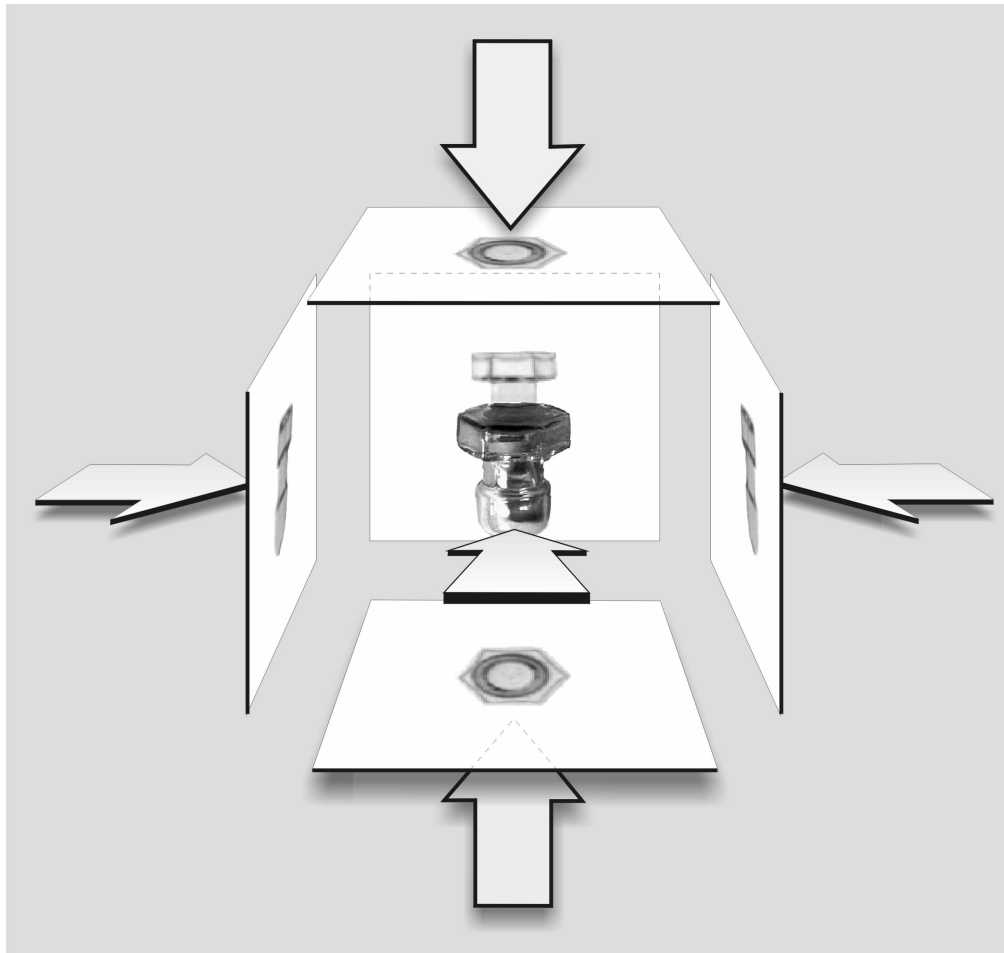


Abbildung 13 Modell für die Entstehung von Projektionen: Der (teilweise transparente) Glas-Stopfen wird in Richtung der Pfeile (Projektionsrichtung) “durchleuchtet”, das Projektionsbild entsteht auf der korrespondierenden hellen Projektionsfläche. Im Gegensatz zu normalen Oberflächenansichten, wie die Fotografie sie liefert, enthalten die Projektionsbilder auch Rauminformation. So ist das in vertikaler Richtung erzeugte Projektionsbild gleich, unabhängig davon, ob von oben nach unten oder von unten nach oben projiziert wurde. Eine Fotografie wäre in beiden Ansichten verschieden und würde keine Rauminformation des Objektes liefern.

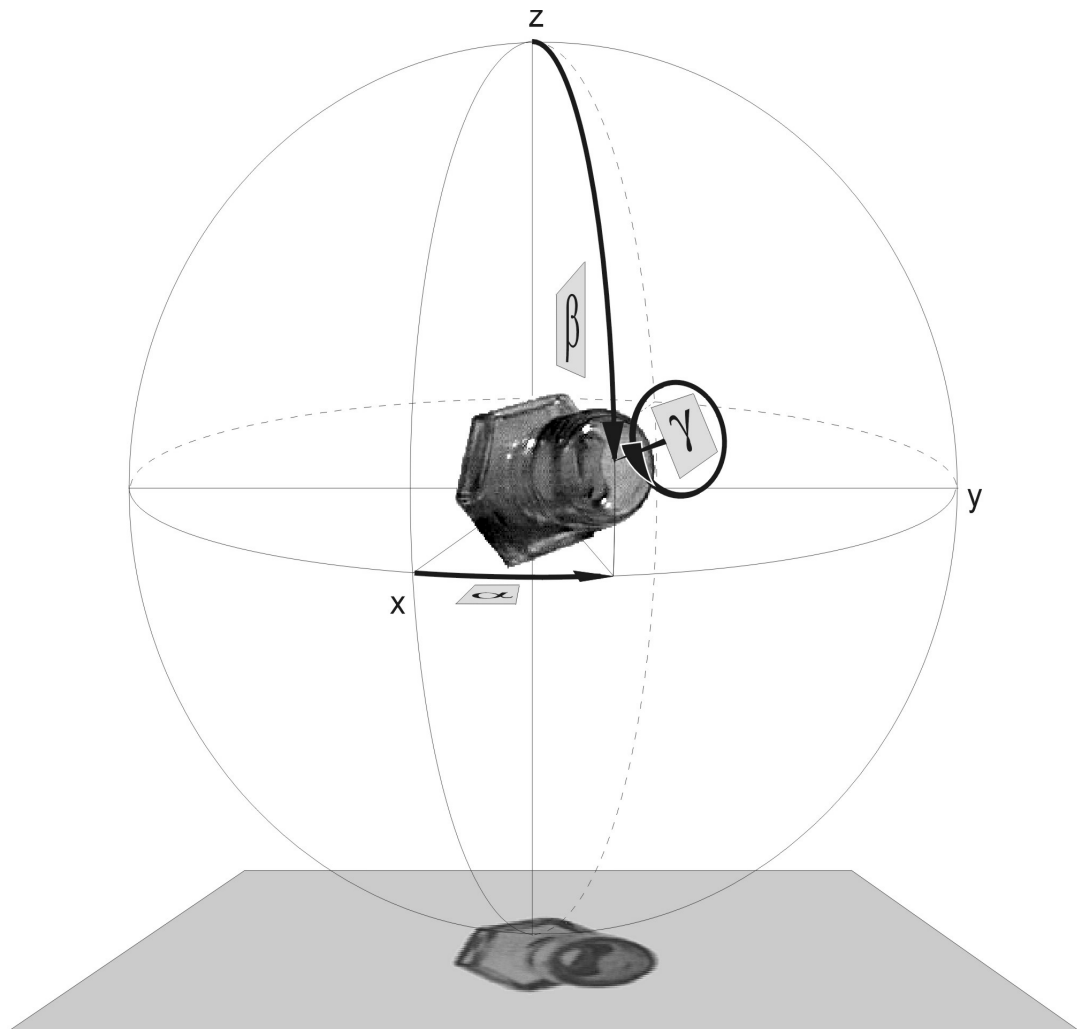


Abbildung 14 Modell für die Definition der Eulerwinkel: Die dem Projektionsbild des Glas-Stopfens (unten) entsprechende Lage des Stopfens im Raum ist durch die Euler-Winkel α , β und γ beschreibbar. Das Modell zeigt deren Definition bezüglich der x-, y- und z-Achse.

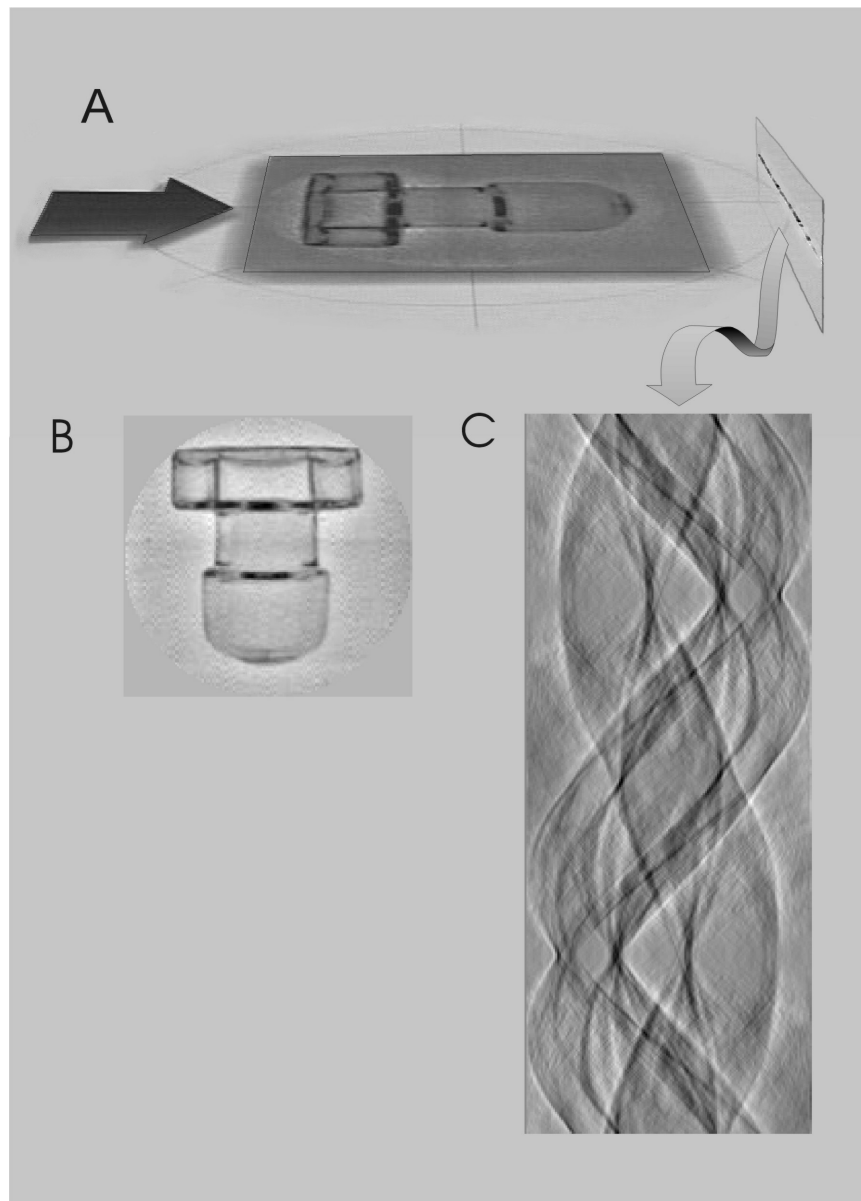


Abbildung 15 Bildung eines Sinogrammes: Werden alle Dichten des in B gezeigten 2D-(Projektions-)Bildes in Pfeilrichtung aufsummiert, entsteht eine 1D-(Linien-)Projektion (A). Wird dieser Vorgang innerhalb der Bildebene in 1-Grad-Schritten wiederholt, entstehen 360 solcher 1D-Projektionen. Werden diese übereinandergestapelt, erhält man ein sogenanntes Sinogramm mit der Breite des ursprünglichen 2D-Bildes und mit einer Länge von 360 Pixeln.

Wird dies für ein zwei-dimensionales (Projektions-)Bild in 1-Grad-Schritten wiederholt und werden die dabei erhaltenen 360 1D-Linien-Projektionen übereinandergestapelt, erhält man erneut ein zwei-dimensionales Bild, ein sogenanntes “Sinogramm” (Abbildung 15 C). Solch ein Sinogramm wird von jedem 2D-Projektionsbild (also den nach der Klassifizierung vorliegenden Klassensummen) einer 3D-Struktur berechnet. Jedes Sinogramm eines 2D-Projektionsbildes einer 3D-Struktur besitzt mindestens eine Linie, die sich ebenso an anderer Stelle in dem Sinogramm eines zweiten 2D-Projektionsbildes dieser 3D-Struktur finden läßt. Um die gemeinsame Linie zu finden, wird die Kreuzkorrelation zwischen jeder Linie des ersten Sinogrammes mit allen 360 Linien des zweiten Sinogrammes berechnet. Es ergibt sich eine Matrix aus 360×360 Kreuzkorrelationswerten. Ordnet man diesen Werten Helligkeiten zu, ergibt sich ein 360×360 Pixel großes Sinogramm-Korrelationsbild, dessen Maximum mit der Lage der gemeinsamen 1D-Linien-Projektionen korrespondiert, aus der die Euler-Winkel der jeweiligen 2D-Projektionen (entsprechend ihrer relativen räumlichen Orientierung) bestimmt werden können.

4.6. Rückprojektion

Nachdem die relative räumliche Orientierung der Projektionen durch die Ermittlung der zugehörigen Eulerwinkel bestimmt ist, kann die dreidimensionale Struktur berechnet werden. Dazu wird das Verfahren der gefilterten Rückprojektion (“filtered back projection”) verwendet: Die Helligkeit in jedem Punkt des Projektionsbildes wird im 3D-Raum rückprojiziert, also quasi entlang der Projektionsrichtung “verschmiert”. Da dabei aber aus jedem Punkt der 3D-Struktur durch die sich kreuzenden Linien der Rückprojektionen sternförmige Gebilde werden, in deren Zentrum der eigentliche Punkt liegt, wird eine Filterung notwendig. (Diese Filterung läßt sich am besten im Fourierraum vornehmen, für Einzelheiten siehe van Heel und Harauz, 1986). Die Summe aller Rückprojektionen bildet die 3D-Struktur. Da die Darstellung der 3D-Struktur als waagerechte Schnitte wenig anschaulich ist, wird das Objekt gewöhnlich als Oberflächenansicht einer dreidimensionalen Struktur dargestellt. Durch “rendering”, d.h. durch Belegung mit einer Textur unter Einbeziehung künstlicher Lichtquellen entsteht ein pseudo-dreidimensionaler Eindruck der Struktur. Ein recht realer (Oberflächen-) Eindruck der Struktur kann durch die

Berechnung kontinuierlicher Stereopaare erzielt werden.

4.7. Bestimmung der Auflösung

Um nach Rekonstruktion einer 3D-Struktur die erreichte Auflösung und damit die tatsächlich vorliegende Strukturinformation abschätzen zu können, wird eine Auflösungsbestimmung vorgenommen. Dazu wird die Fourier-shell-correlation (FCS) [Harauz & van Heel, 1986] zwischen zwei 3D-Strukturen ermittelt, die jeweils aus der Hälfte aller vorkommenden Projektionen (also aller vorliegenden Klassensummen) errechnet wurden. Das bedeutet, daß die beiden 3D-Strukturen jeweils fouriertransformiert werden. Mit zunehmendem Abstand vom Mittelpunkt werden im Fourierraum höhere Raumfrequenzen, also feinere Strukturdetails dargestellt. Die Auflösungsgrenze entspricht dem Radius, für den gerade noch eine signifikante Ähnlichkeit zwischen beiden 3D-Strukturen besteht (für Details siehe Harauz und van Heel (1986)).

5. Ergebnisse

5.1. Ermittlung geeigneter Untersuchungsparameter

Vorrangiges Ziel der Arbeit war es, die Struktur des HA zu erfassen, die der fusionsaktiven Struktur entspricht. Vorversuche mit dem Rasterkraftmikroskop (AFM) zeigten, daß mit dieser Technik, bedingt durch die Flexibilität des Virus und seiner Spike-Proteine, selbst im sogenannten “tapping mode” die Aufklärung supramolekularer Strukturen am intakten Virus äußerst problematisch sein würde. Bei allen anderen zur Verfügung stehenden Techniken zur Strukturaufklärung muß das Protein in irgendeiner Weise “fixiert” werden. Dabei wird selbstverständlich versucht, das Protein in einem möglichst “natürlichen” Zustand zu halten, trotzdem wird es im Moment der Fixierung zu einem artifiziellen System ohne biologische Funktionalität. Egal, ob Kristalle gezüchtet werden oder ob das Protein in vitrifiziertem Eis eingebettet wird, danach ist kein direkter Nachweis mehr über die biologische Funktion des Proteins in diesem Zustand möglich. Das verdeutlicht die Bedeutung der Wahl geeigneter Untersuchungsbedingungen.

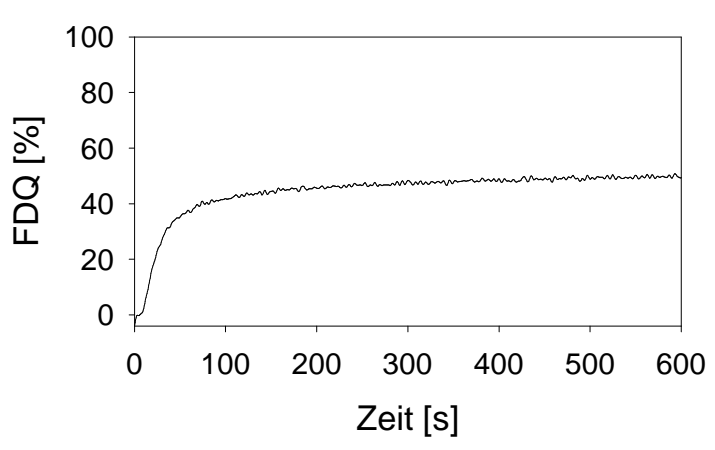
Über diesen methodischen Gesichtspunkt zur Wahl günstiger Untersuchungsbedingungen hinaus gibt es noch eine Reihe inhaltlicher Aspekte: Wie bereits in der Einleitung dargelegt, herrscht trotz unterschiedlicher Fusionsmodelle Einigkeit darüber, daß die Fusion über eine Kaskade verschiedener struktureller Intermediate abläuft [Stegmann et al., 1990; White, 1995, Chernomordik et al., 1999]. Auch die Konformationsänderung des HA muß nicht zwangsläufig in einem Schritt erfolgen. Die röntgenkristallografisch aufgeklärte Teilstruktur des HA (TBHA2), die thermostabiler ist als das HA bei neutralem pH-Wert [Ruigrok et al., 1988; Wharton et al., 1995], wird allgemein mit der finalen Struktur der pH-induzierten Konformationsänderung(en) assoziiert. Dabei bleibt unklar, inwieweit diese Teil-Struktur tatsächlich für den Fusionsvorgang relevant ist [White, 1995]. Zudem verhalten sich die verschiedenen Subtypen des HA hinsichtlich Fusion und Inaktivierung unterschiedlich. Es ist also notwendig, den Fusionsweg bzw. auftretende Intermediate auf diesem Weg genauer zu charakterisieren, um entscheiden zu können, mit welchem HA (Influenzastamm) und unter welchen Bedingungen die

“Fixierung” - quasi als Momentaufnahme in der Kaskade der Fusion - vorgenommen wird. Die Frage lautet dabei: Welcher Zustand auf dem Weg der Konformationsänderung stellt einen “fusionskompetenten” Schritt dar, d.h. wo in der Kaskade tritt eine Struktur auf, aus der heraus sich eine Fusionspore bilden kann. Vermieden werden soll dagegen auf jeden Fall eine Strukturaufklärung, die eine 3D-Struktur einer inaktivierten Form oder einer “post-fusogenen” Form liefert (in vivo würde letztere u. U. einen leichteren Abbau des HA nach erfolgter Fusion ermöglichen).

Eine Möglichkeit, den Weg der Fusion besser aufzulösen, ist die Variation physikochemischer Parameter.

5.1.1. Fusionsverhalten

Das Fusionsverhalten von Influenza mit verschiedensten Targetsystemen ist sehr weitreichend charakterisiert, deshalb soll nachfolgend nur kurz darauf eingegangen werden.

Influenza-Stamm	HA-Subtyp	Kinetik der Fusion mit Erythrozytenghosts bei pH 5,0, 37°C (Fluoreszenzdequenching von R18)
A/PR/8/34	H1	

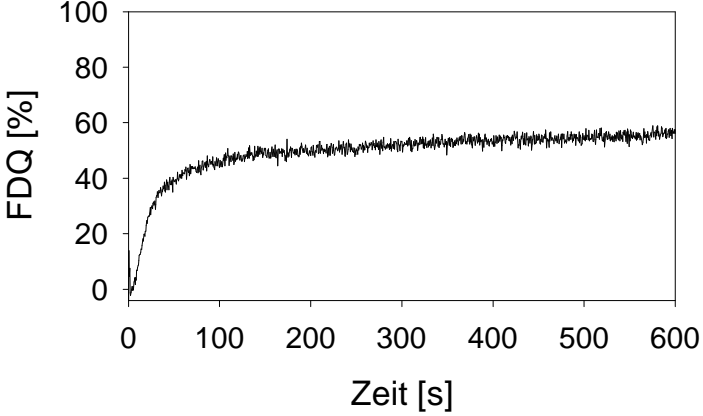
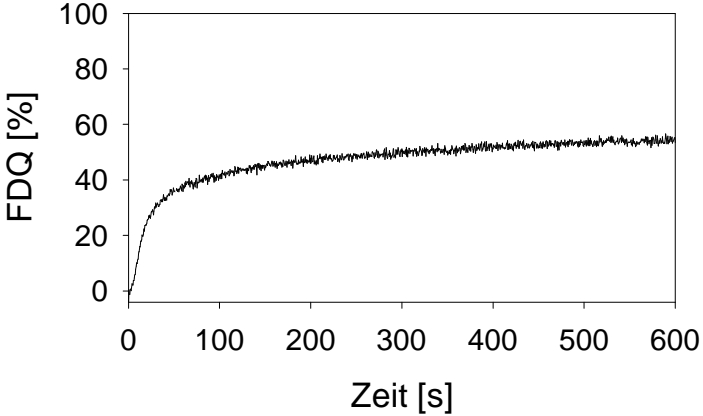
A/Japan/ 305/57	H2	
X-31 (Re- kombinante mit HA von A/AICHI/68)	H3	

Tabelle 2: Fusionskinetik (Fluoreszenzdequenching von R18, s. “Material und Methoden”) verschiedener Influenzastämme mit Erythrozytenmembranen (“Ghosts”). Zum Zeitpunkt $t=0$ wurden die Virus-Zell-Suspensionen zu vorgewärmten (37°C) Natriumacetatpuffer mit pH 5,0 gegeben.

Tabelle 2 zeigt die Fusionskinetiken von drei verschiedenen Influenzastämmen mit Erythrozytenmembranen (gemessen mittels Fluoreszenzdequenching von R18). Die drei verwendeten Influenza A Stämme gehören unterschiedlichen HA-Subtypen an, zeigen aber ähnliche Fusionskinetiken.

Allerdings wird mit den gezeigten Fusionskinetiken frühestens das Lipidmixing detektiert (siehe Einleitung: “Die Fusion”). Das Fusionsausmaß ist damit für unseren Ansatz (Findung günstiger Untersuchungsbedingungen zur 3D-Rekonstruktion der fusionsaktiven Struktur) nur insofern ein geeigneter Untersuchungsparameter, als daß Aussagen darüber getroffen werden können, ob überhaupt Fusion abläuft. Zur Beschreibung der vorgelagerten Intermediate ist es dagegen weniger geeignet.

Wie gezeigt wurde, folgt die Fusion der Erniedrigung des pH-Wertes, welche bei Influenza das fusionsauslösende Moment (“Trigger”) der Fusion darstellt, mit einer gewissen Verzögerung (“delay- oder lag-time”) [z.B. Clague et al., 1991]. Während dieser Lag-Zeit spielen sich offenbar die dem Lipidmixing vorgelagerten Schritte der HA-vermittelten Membranfusion ab. Unter optimalen Fusionsbedingungen (37°C, pH-Wert um 5) ist dieses Lag aber ohne besonderen meßtechnischen Aufwand (stopped-flow) kaum auflösbar (siehe Tabelle 2).

Um die Kaskade struktureller Intermediate der Fusion besser auflösen zu können, ist es daher sinnvoll, die Fusion unter suboptimalen Bedingungen zu verfolgen. Wie aus zahlreichen Untersuchungen bekannt ist, hängt die Kinetik der Fusion von Influenza mit entsprechenden Membranen sowohl von der Temperatur als auch vom pH-Wert ab.

5.1.2. Variation der Temperatur

Spektrofluorimetrisch gemessene Fusionskurven wie die in Tabelle 2 können als kumulative Verteilungsfunktionen der Lag-Zeiten der Gesamtpopulation der an die Ziellmembranen gebundenen Viren verstanden werden [Ludwig et al., 1995]. Der Beginn der Fusion, d.h. der erste sichtbare Anstieg der Fluoreszenzkurve beschreibt demnach die Subpopulation der Viren, die zuerst in Fusion übergeht. Diese Lag-Zeit wird im folgenden als t_{lag} bezeichnet.

Abbildung 16 zeigt die Temperaturabhängigkeit der frühen Phase der Kinetik am Beispiel von Influenza A/PR/8/34.

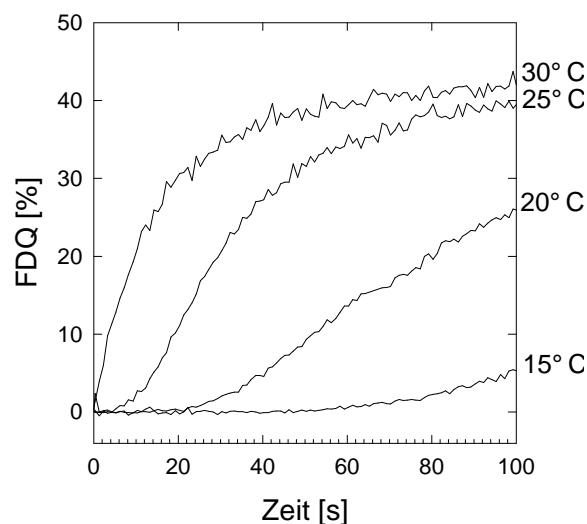


Abbildung 16 Temperaturabhängigkeit der frühen Phase der Fusionskinetik (Fusion von A/PR/ 8/34 mit “Ghosts” bei pH 5,0)

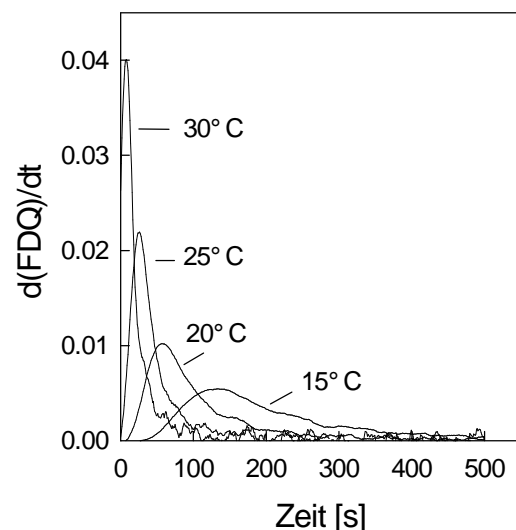


Abbildung 17 erste Ableitung ($d(\text{FDQ})/dt$) der Fusionskurven aus Abbildung 16

Die Abhängigkeit der Fusion von der Temperatur wurde in unserer Arbeitsgruppe für Influenza A/PR/8/34, Influenza A/Japan/305/57 und Influenza X-31 sehr ausführlich untersucht [Korte, 1995]. Bei allen drei Stämmen kommt es mit einer abnehmender Temperatur T neben einer Verringerung des Fusionsausmaßes zu einer Verlängerung von t_{lag} . Trägt man die erste Ableitung der Fusionskurven aus Abbildung 16 ($d(\text{FDQ})/dt$) auf, erhält man die Häufigkeitsverteilung der sich ereignenden Einzel-Fusionsereignisse -also der “individuellen Lag-Zeiten τ_{lag} ”- bei entsprechenden Temperaturen (Abbildung 17).

Es ist ersichtlich, daß Temperaturerniedrigung zu einer Verlangsamung der Fusion führt.

Ein Vergleich von A/PR/8/34 mit den anderen Stämmen zeigt, daß die Temperaturabhängigkeit für A/PR/8/34 am stärksten ausgeprägt ist. Wie in Abbildung 2 zu sehen, ist t_{lag} für $T=15^{\circ}\text{C}$

schon länger als 40 s, für $T < 10^\circ\text{C}$ konnte (im Gegensatz zu X-31 und A/Japan) keine Fusion mehr gemessen werden.

Für Influenza A/PR/8/34 läßt sich also die “Fusionskaskade” durch Temperaturänderung sehr gut spreizen, allerdings bleibt offen, inwieweit die Temperaturniedrigung die Konformationsänderung beeinflußt.

Um kontinuierlich die Konformationsänderung verfolgen zu können, wurde die Fluoreszenz des Fluorophores “1,1'-bis(4-anilino)naphthalene-5,5'-disulfonic acid” (bis-ANS) in Gegenwart von isoliertem HA von Influenza A/PR/8/34 gemessen. Bis-ANS bindet an hydrophobe Bindungsstellen bei gleichzeitiger signifikanter Erhöhung der Fluoreszenzintensität, d. h. der Quantenausbeute [Korte & Herrmann, 1994]. Wie in Abbildung 18 ersichtlich, ist selbst bei 15°C eine sofortige Erhöhung der Fluoreszenz meßbar, d.h. die ersten Konformationsänderungen des HA erfolgen ohne meßbare Verzögerung. Das bei der Fusion bei 15°C sichtbare Lag von mehr als 40 s hat seine Ursache also nicht in einer durch die niedrige Temperatur bedingten Verzögerung der Konformationsänderung.

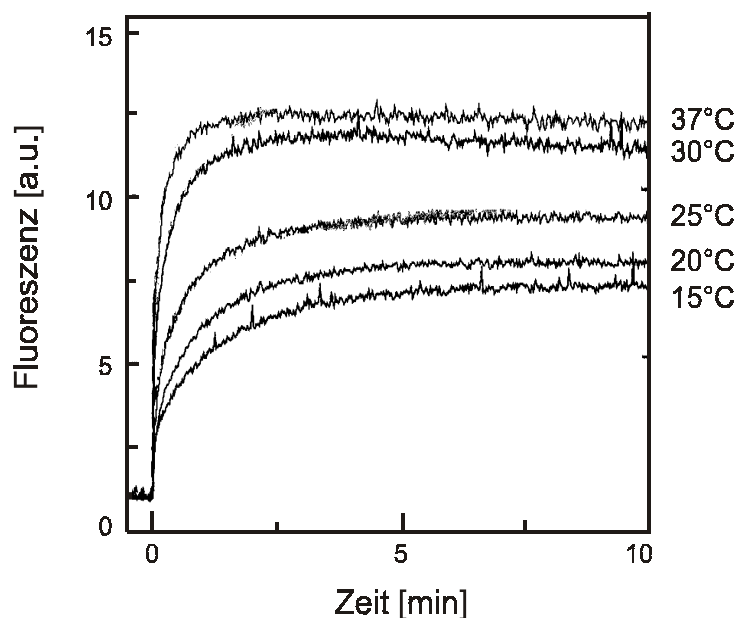


Abbildung 18 Fluoreszenz des Fluorophores bis-ANS in Gegenwart von isoliertem HA von Influenza A/PR/8/34. (Daten wurden normiert auf das Fluoreszenzausmaß bei pH 7,4 bei jeder Temperatur)

Dieser Befund deckt sich mit Ergebnissen von Pak und Mitarbeitern, die zeigen konnten, daß der Verlust der Fusionsaktivität von Influenza A/PR/8/34 bei Temperaturen unter 10°C nicht mit dem Ausbleiben der Exponierung der Fusionssequenz, die mit einer Konformationsänderung assoziiert wird, erklärbar ist [Pak et al., 1994]. Selbst bei A/PR/8/34, dem Stamm, der die stärkste Temperaturabhängigkeit der drei untersuchten Stämme zeigt, ist auch bei niedrigen Temperaturen eine Konformationsänderung zu erwarten.

5.1.3. Rolle des Rezeptors

Wie in der Einleitung (s. "Das Hämagglutinin") ausgeführt, bindet HA an zelluläre Rezeptoren. Durch Fusion mit großen unilamellaren Lipidvesikeln (LUV), die keine Rezeptoren enthalten, konnten wir zeigen, daß nach pH-Erniedrigung Fusion auch in Abwesenheit von zellulären Rezeptoren abläuft, wenn auch mit niedrigerer Effektivität (Abbildung 19). Dieses Ergebnis deckt sich mit Befunden anderer Gruppen [Lima et al. 1995; Stegmann et al., 1995]. Dabei können keine Aussagen zum Mechanismus gemacht werden. Der Mechanismus der Fusion kann, muß aber nicht zwangsläufig derselbe sein wie bei Fusion nach Bindung an zelluläre Rezeptoren. Die größere Effizienz der Fusion nach Rezeptorbindung könnte auf die korrekte Anordnung der HA-Trimere untereinander und/oder relativ zur Zellmembran zurückzuführen sein. Andererseits existieren Vorstellungen, daß jene HA, die an die zellulären Rezeptoren binden, nicht gleichzeitig die Fusion vermitteln [Ellens et al., 1990, Alford et al., 1994]. Da für die Ausbildung der Fusionspore wahrscheinlich - wie bereits ausgeführt - eine Kooperativität mehrerer HA-Trimere erforderlich ist, könnte die Bindung an zelluläre Rezeptoren trotzdem für die richtige Anordnung der HA-Trimere an der Fusionsstelle und damit für die Effizienz der Fusion von Bedeutung sein. Das Auftreten der pH-abhängigen Fusion in Abwesenheit jeglicher Rezeptoren zeigt aber zumindest, daß mit Sicherheit eine Konformationsänderung des HA stattfindet, die Fusion zu vermitteln in der Lage ist. Dieser Befund ist insofern von Bedeutung, da unter den Untersuchungsbedingungen, die zu einer dreidimensionalen Rekonstruktion der fusionsaktiven Konformation des HA führen sollen, auch keine Rezeptoren anwesend sind.

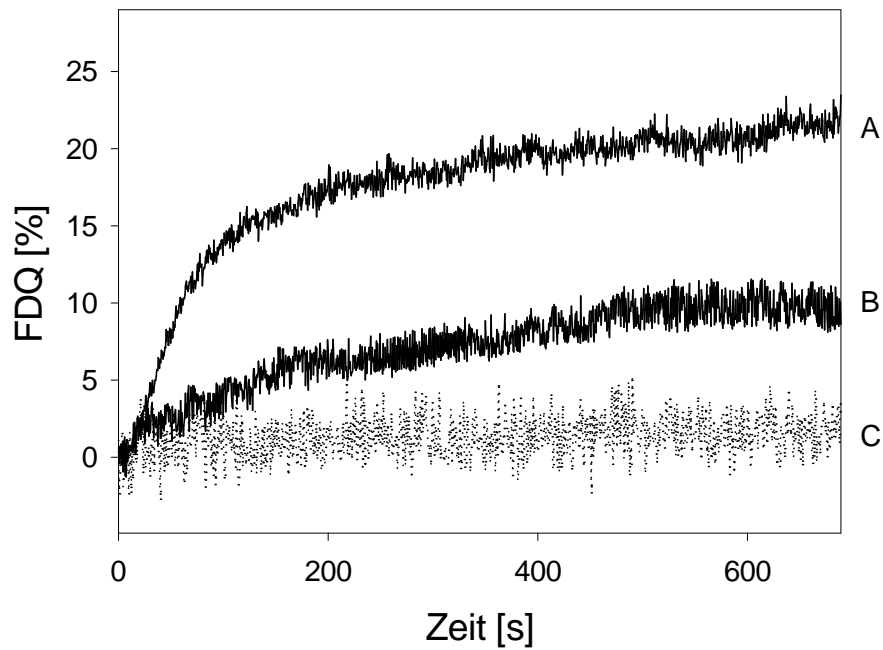


Abbildung 19

Fusion von Influenzavirus A/Japan/305/57 mit

Kurve **A**: Erythrozytenmembranen (Kontrolle) bzw.

Kurve **B**: LUV (L- α -DOPC und L- α -PE, Typ III, egg yolk, im mol. Verhältnis 2:1) bei pH 5,0 und 20°C bzw.

Kurve **C** (punktierten Linie): LUV bei pH 7,0 und 20°C.

Die Fusion wurde gemessen durch Fluoreszenzdequenching von R18.

5.1.4. Inaktivierung

Wie schon erwähnt, erfordert eine 3D-Rekonstruktion aus Klassensummen von elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Einzelpartikeln, daß die Partikel -in unserem Falle die HA-Trimere- weitgehend isomorph vorliegen. Handelt es sich nicht um eine homogene Probe, das heißt liegen die Hämagglutinin-Trimere in verschiedenen Konformationen vor, scheitert die dreidimensionale Rekonstruktion, die verschiedenen Klassensummen ergeben kein in sich schlüssiges dreidimensionales Objekt. Das bedeutet, daß spätestens beim Versuch einer 3D-Rekonstruktion aus gemittelten Klassensummen eine vorhandene Heterogenität der Probe offenbar würde. Um aber den der 3D-Rekonstruktion zwangsläufig vorausgehenden Aufwand der Präparation, der Elektronenmikroskopie und der Bildverarbeitung nicht umsonst zu treiben, ist es wünschenswert, Bedingungen zu finden, unter denen ein höchstes Maß an Homogenität gewährleistet ist.

Wie bereits betont, sollte vorrangig eine 3D-Rekonstruktion einer bereits *inaktivierten* Konformation des HA vermieden werden. Die Forderung nach einer homogenen Probe schließt sowohl die Beteiligung aller anwesenden HA-Trimere an der Konformationsumwandlung als auch die nahezu vollständige Abwesenheit inaktivierter HA-Trimere ein.

Der unter suboptimalen Bedingungen stattfindende Rückgang des Ausmaßes der Fusion könnte seine Ursache in einer teilweise ausbleibenden Konformationsumwandlung oder in parallel ablaufender Inaktivierung haben.

Es wurde deshalb die Fusion von Influenzavirus mit Erythrozytenghosts bei suboptimalem pH-Wert (pH 5,6, 25°C) gemessen und nach verschiedenen Zeiten wurde der pH-Wert zu pH 5,0 abgesenkt. Wie Abbildung 20 zeigt, wird unabhängig vom Zeitpunkt der nachträglichen pH-Erniedrigung auf pH 5,0 das Fusionsausmaß der Fusion der Kontrolle (pH 5,0) erreicht. Abbildung 21 zeigt die Fusion nach Inaktivierung durch Vorinkubation der Viren bei pH 5,6 und 25°C für entsprechende Zeiten (siehe "Material und Methoden"). Mit hoher Wahrscheinlichkeit läuft also die Inaktivierung des HA nicht parallel zur Fusion ab.

Ramalho-Santos und Mitarbeiter (1996) fanden, daß bei Fusionsexperimenten die Virionen, die nicht an der Fusion beteiligt waren, nicht inaktiviert waren, sondern nach Isolierung und erneutem Einsatz in Fusionsversuchen wieder Fusion zeigten. Ursache für das niedrigere

Fusionsausmaß bei suboptimalen Bedingungen ist also nicht die fehlende Konformationsumwandlung oder gar Inaktivierung.

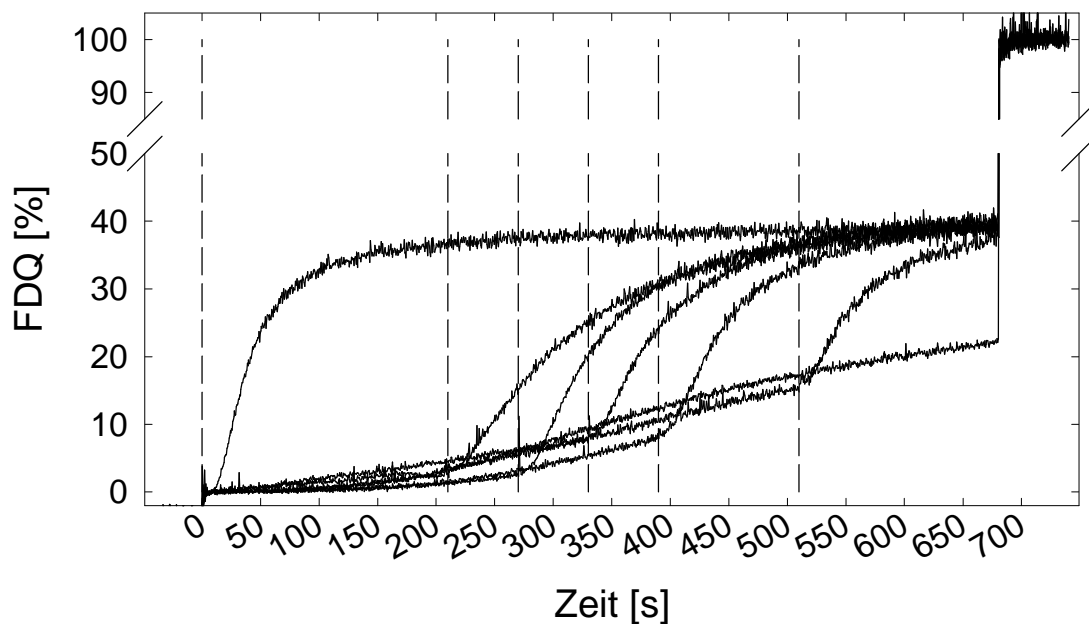


Abbildung 20 Fusion von Influenzavirus A/PR/8/34 mit Erythrozytenmembranen bei pH 5,0 (Kontrolle) bzw. pH 5,6, 25°C. Die Fusion wurde gemessen durch Fluoreszenzdequenching von R18. Die punktierten Linien markieren die Zeitpunkte, an denen durch Zugabe von Zitronensäure (250 mM) der pH-Wert von pH 5,6 auf pH 5,0 erniedrigt wurde.

Es existieren also deutliche Indizien, daß bei Anwesenheit einer Zielmembran die HA-Trimere, die nicht an der Fusion beteiligt sind, nicht inaktiviert werden.

Stattdessen gibt es Hinweise, daß die fusionsaktive Konformation nur ein Intermediat auf dem Weg zur inaktiven Konformation ist (siehe auch "Diskussion") und da das HA für die elektronenmikroskopische Präparation nicht an Rezeptoren gebunden vorliegt, sind Bedingungen zu wählen, in denen das HA mit Sicherheit nicht in die inaktivierte Konformation "weiterläuft".

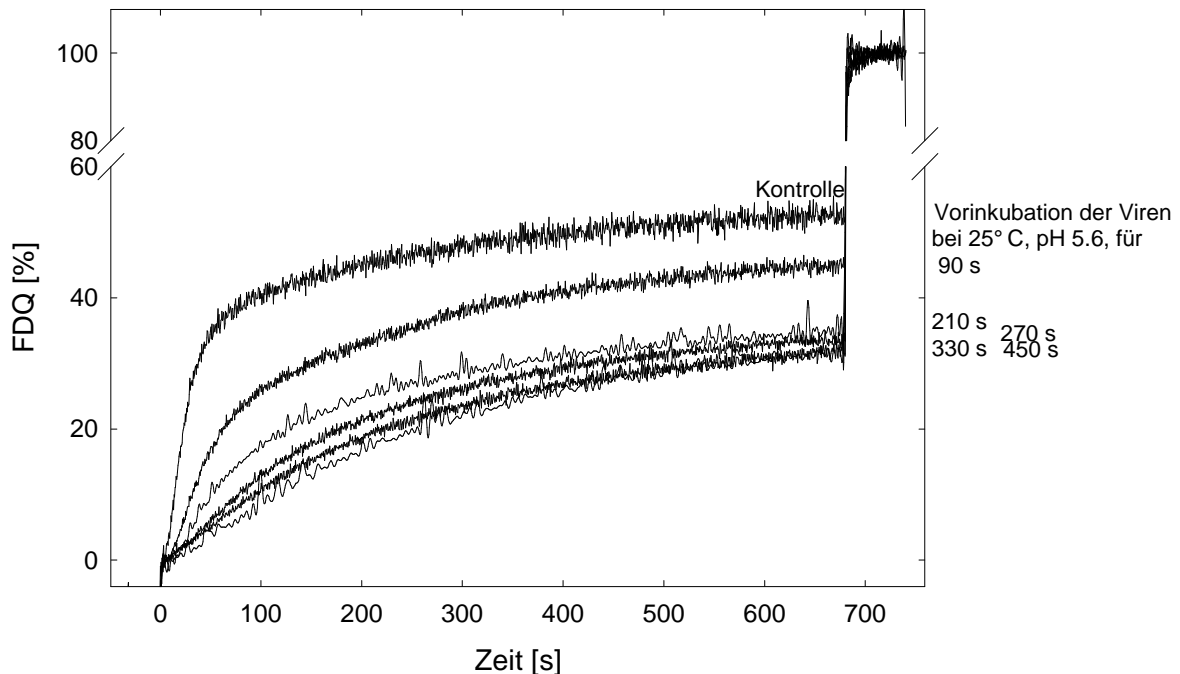


Abbildung 21

Fusion von Influenzavirus A/PR/8/34 mit Erythrozytenmembranen nach Inaktivierung durch Vorinkubation der Viren bei pH 5,6 und 25°C für die rechts angegebenen Zeiten. Die Fusion wurde gemessen durch Fluoreszenzdequenching von R18.

Werden Virionen, deren HA noch nicht an Membranen gebunden ist, bei Bedingungen, die dem Fusionsoptimum entsprechen, inkubiert, führt dies aber immer zu Inaktivierung.

Obwohl die Inaktivierung von HA des Stammes A/Japan deutlich geringer ist als die der Stämme X-31 oder A/PR/8/34 (und A/Japan deshalb für unseren experimentellen Ansatz am geeignetsten schien), konnten wir nach zehnminütiger Vorinkubation bei pH 5,0 und 37°C schon eine leichte Inaktivierung (ca. 5%) messen [Korte et al., 1997].

Bei 4°C, pH 5,0 ließ sich keine Inaktivierung mehr feststellen. Trotzdem konnten wir unter

diesen Bedingungen nach 10 min (pH 5,0, 5°C) deutliche Fusion von Influenza A/Japan mit Erythrozytenmembranen messen (Abbildung 22), ein Hinweis darauf, daß das HA unter diesen Bedingungen in die fusionskompetente Konformation übergeht! Das geringere Fusionsausmaß bei der niedrigeren Temperatur ist wahrscheinlich auf die deutlich reduzierte Fähigkeit der Erythrozytenmembranen, die viralen Glykoproteine zu inkorporieren, zurückzuführen [Ramalho-Santos et al., 1996].

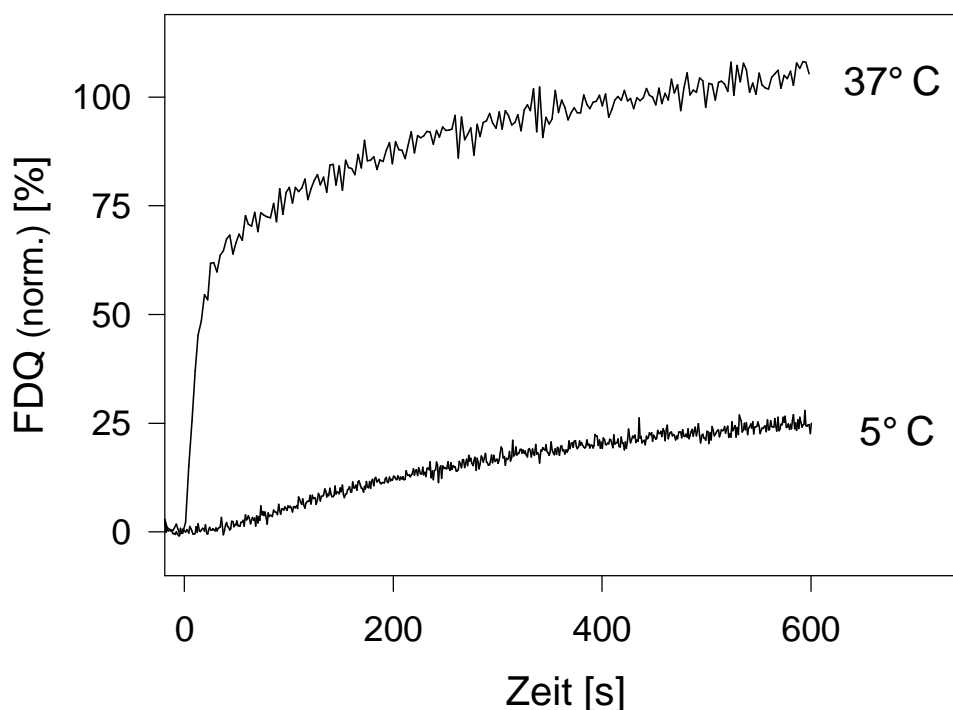


Abbildung 22 Kinetik der Fusion von R18-markierten Influenzaviren vom Stamm A/Japan/305/57 bei pH 5,0 und 5°C bzw. 37°C. Das Fluoreszenz-Ausmaß wurde normiert auf das Fluoreszenzdequenching (FDQ) bei pH 5,0, 37°C nach 10 Minuten (= 100%). Wie ersichtlich wird, beträgt das Fluoreszenzdequenching nach 10 Minuten bei pH 5,0, 5°C ca. 25% des FDQ bei pH 5,0, 37°C.

5.1.5. Verwendung HA-exprimierender Zellen

Um diesen Befund zu verifizieren, benutzten wir HA-exprimierende Zellen. HA-exprimierende Zellen weisen eine geringere HA-Dichte als Viren auf, die Fusionskinetiken sind dadurch sensitiver gegenüber der Variation physikochemischer Bedingungen. Gleichzeitig wird ein eventueller Einfluß anderer viraler Proteine auf die Fusion durch deren definitive Abwesenheit ausgeschlossen.

Es wurde die Fusion von GP4f-Zellen (Mausfibroblasten, die stabil das HA von Influenza A/Japan/305/57 exprimieren¹) mit R18-gelabelten Erythrozyten gemessen. Abbildung 23 zeigt die Temperaturabhängigkeit der Kinetik der Fusion von GP4f-Zellen mit Erythrozyten.

Wie bereits erwähnt, läuft bei niedriger Temperatur (um 4°C) und pH-Werten um 5 keine Inaktivierung mehr statt. Wie in Abbildung 23 zu sehen, zeigen auch die HA(A/Japan)-exprimierenden Zellen unter diesen Bedingungen schon deutlich Fusion. Da bereits bei einer Temperatur um 5°C Fusion auftritt, muß davon ausgegangen werden, daß das Hämagglutinin von Influenza A/Japan nach einer Zeit von 10 Minuten selbst bei dieser niedrigen Temperatur eine fusionskompetente Konformation eingenommen hat. Um zu prüfen, ob das niedrigere Fusionsausmaß nicht etwa auf eine begrenzte Anzahl von HA-Trimeren, die unter diesen Bedingungen eine fusionskompetente Konformation eingenommen haben, zurückzuführen ist, wurde folgendes Experiment durchgeführt:

Mit R18 markierte menschliche Erythrozyten wurden an GP4F-Zellen gebunden, die das Hämagglutinin von Influenza A/Japan exprimieren.

Wurden diese Zell-Zell-Komplexe für nur 80 Sekunden bei pH 5,0 auf Eis inkubiert (Bedingungen, unter denen keine Fusion beobachtet werden kann, vergleiche Abbildung 23) und danach wieder reneutralisiert, konnte der als "commitment" bezeichnete Zustand initiiert werden [Schoch et al., 1992].

¹Die GP4f-Zellen wurden uns dankenswerterweise von Robert Blumenthal, NIH Bethesda, USA, zur Verfügung gestellt.

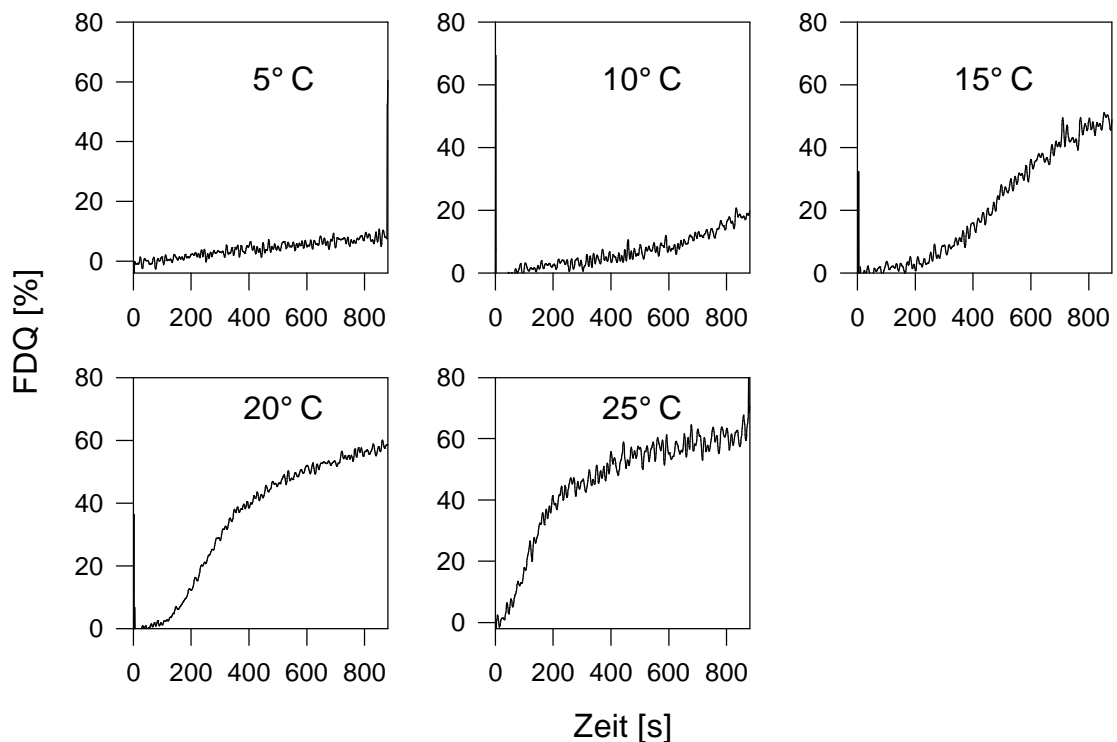


Abbildung 23 Temperaturabhängigkeit der Kinetik der Fusion von HA-exprimierenden GP4f-Zellen mit zuvor gebundenen R18-markierten Erythrozyten bei pH 5,0. (siehe 3.9. und 3.13. in “Material und Methoden”)

Die sauer vorinkubierten und reneutralisierten HA-exprimierenden Zellen fusionieren sogar bei neutralem pH, sobald die Temperatur erhöht wird. Dabei wird nach entsprechender Zeit und bei entsprechender Temperatur ein Fusionsausmaß erreicht, das mit der Fusion unter sauren pH-Bedingungen (ohne Vorinkubation) vergleichbar ist (Abbildung 24). Diese kurze saure Inkubation reicht also offenbar aus, die HA-exprimierenden Zellen zur Fusion zu “verpflichten”, das heißt, die Hämagglutinin-Trimere durchlaufen eine Konformationsveränderung, die durch die Reneutralisation nicht rückgängig gemacht wurde. Dieser Befund spricht dafür, daß bei der Fusion bei niedrigeren Temperaturen nicht etwa nur ein kleiner Teil

von Hämagglutinin-Trimeren eine Konformationsänderung vollzieht, da in diesem Falle das Fusionsausmaß nach “commitment” nicht nahezu gleich groß wäre wie bei der Fusion ohne Vorinkubation.

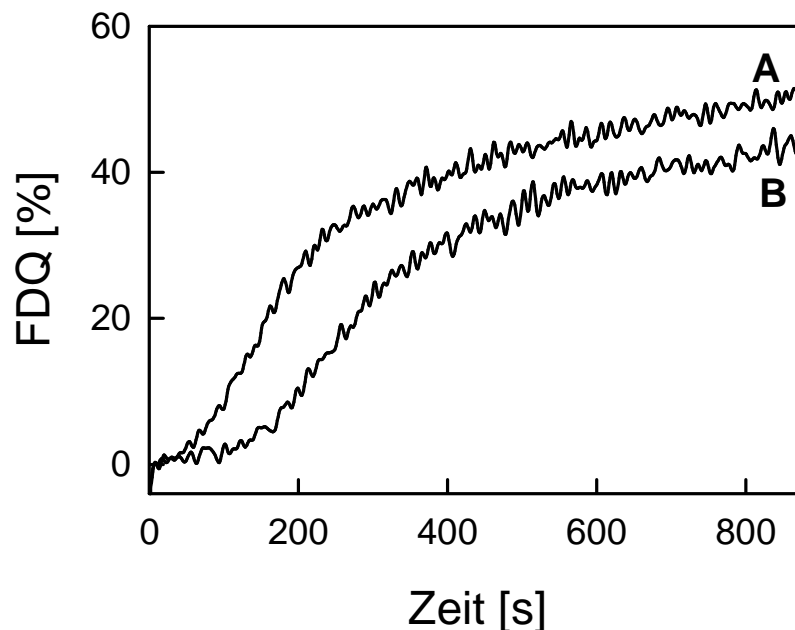


Abbildung 24 Durch kurze Vorinkubation bei pH 5,0 auf Eis ausgelöstes “commitment (to fusion)” von HA des Stammes A/Japan. Komplexe von R18-markierten Erythrozyten und HA-exprimierenden GP4f-Zellen wurden für nur 80 s bei pH 5,0 auf Eis inkubiert. Nach erfolgter Reneutralisation und Inkubation der Komplexe bei 20°C, pH 7,4 bei gleichzeitiger Fusionsmessung konnte eine schnelle und signifikante Fusion gemessen werden (Kurve A). Das Fusionsausmaß war vergleichbar dem des für die Fusion von Zell-Zell-Komplexen bei pH 5,0 und 20°C gemessenen Ausmaßes ohne Vorinkubation (Kurve B).

Deshalb scheint der Influenza-Stamm A/Japan (H2-Subtyp) für unseren Versuchsansatz, eine 3D-Rekonstruktion einer fusionskompetenten Konformation bei saurem pH durchzuführen, besonders geeignet zu sein, obwohl (oder gerade weil) eine visuelle Beurteilung der HA-Trimere

nach saurer Vorinkubation keine Veränderungen der Morphologie zeigt [Puri et al., 1990]. Nach einer 3D-Rekonstruktion der neutralen Konformation bietet sich eine 3D-Rekonstruktion des HA von A/Japan nach einer Inkubation für 10 Minuten bei pH 5 und 4°C an.

5.1.6. pH-Abhängigkeit der Fusion nach “commitment”

Nach Überführung der HA-exprimierenden Zellen in den “commitment”-Status durch kurze saure Inkubation reicht es aus, die reneutralisierte Zell-Zell-Suspension zu warmem Puffer (z.B. 37°C) neutralen pH-Wertes zu geben, um eine sehr effiziente Fusion mit stark beschleunigter Kinetik auszulösen.

Um die pH-Wert-Abhängigkeit nach “commitment” zu untersuchen, wurden die Komplexe aus GP4f-Zellen und R18-markierten Erythrozyten für 80 s bei pH 5,0 auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellkomplexe zu Puffer von 15°C und entsprechendem pH gegeben und gleichzeitig das Fluoreszenzdequenching als Maß für die Fusion gemessen.

Das Ergebnis zeigt Abbildung 25. Während das pH-Optimum für die Fusion (auch bei Temperaturen <37°C, nicht dargestellt) ohne Vorinkubation bei pH-Werten um 5 liegt (Abbildung 25, linke Spalte), ist das Fusionsoptimum nach “commitment” zu höheren pH-Werten verschoben (Abbildung 25, rechte Spalte). So ist nach Vorinkubation für 80 s bei pH 5,0 auf Eis die Lag-Zeit der Fusion noch bei pH 5,6 und 15°C kürzer als bei der Fusion bei pH 5,0 und 15°C. Auch eine längere Vorinkubation bei pH 5,0 auf Eis (10 min) führte zum qualitativ gleichen Ergebnis (nicht dargestellt).

Dieser Befund bestätigt, daß durch die kurze saure Vorinkubation schon eine (vom niedrigen pH-Wert abhängige) Konformationsänderung am HA stattgefunden hat.

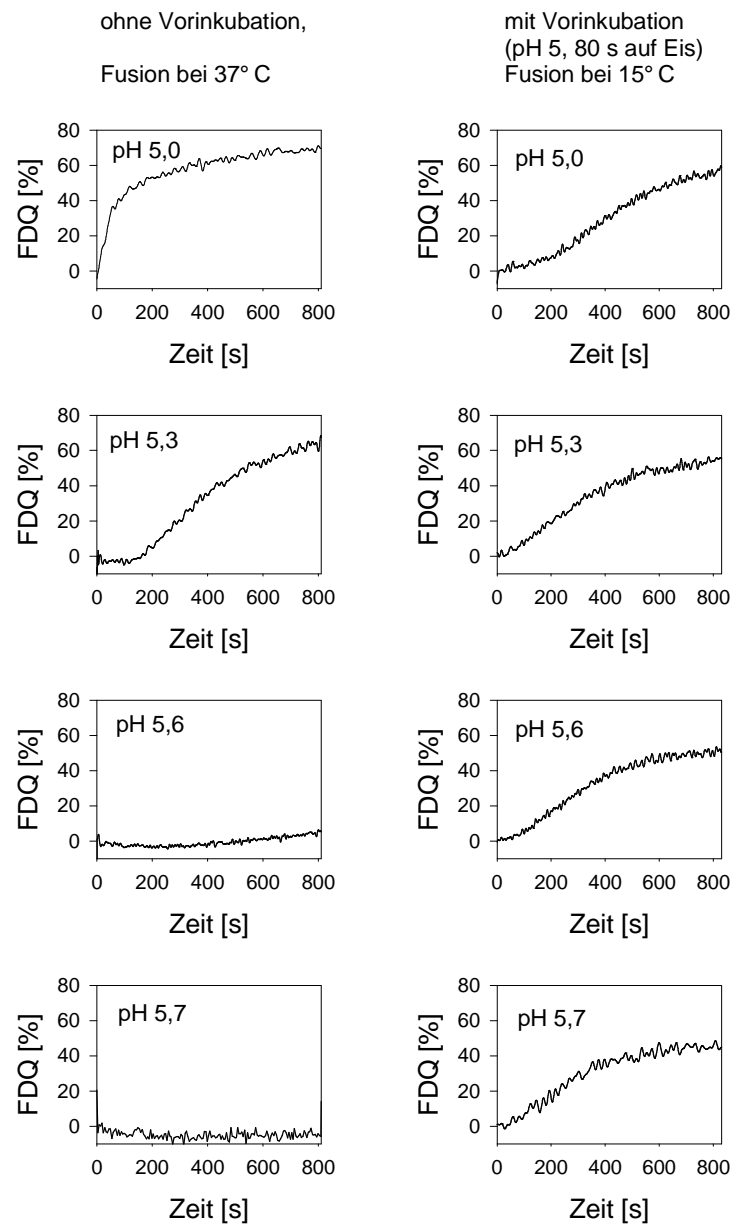


Abbildung 25 pH-Wert-Abhängigkeit der Fusion von Komplexen aus GP4f-Zellen und R18-markierten Erythrozyten: Es wurde ohne Vorinkubation, 37° C (linke Spalte) bzw. nach Vorinkubation für 80 s bei pH 5,0 auf Eis in Puffer von 15° C (rechte Spalte) und entsprechendem pH das Fluoreszenzdequenching als Maß für die Fusion gemessen.

5.1.7. Zugänglichkeit für Proteinase K

Um eventuell quantitativ die Menge des umgewandelten HA spezifizieren zu können, wurde für die ermittelten Versuchsbedingungen die Verdaubarkeit des als am besten für eine 3D-Rekonstruktion einer fusionskompetenten Konformation geeigneten HA (Influenza A/Japan, s. S. 70 f.) mittels Proteinase K getestet [Doms et al., 1985].

Wie Abbildung 26 zeigt, ist HA von Influenza A/Japan nach 10 min Vorinkubation bei pH5, 4°C, weitgehend resistent gegen Proteinase K.

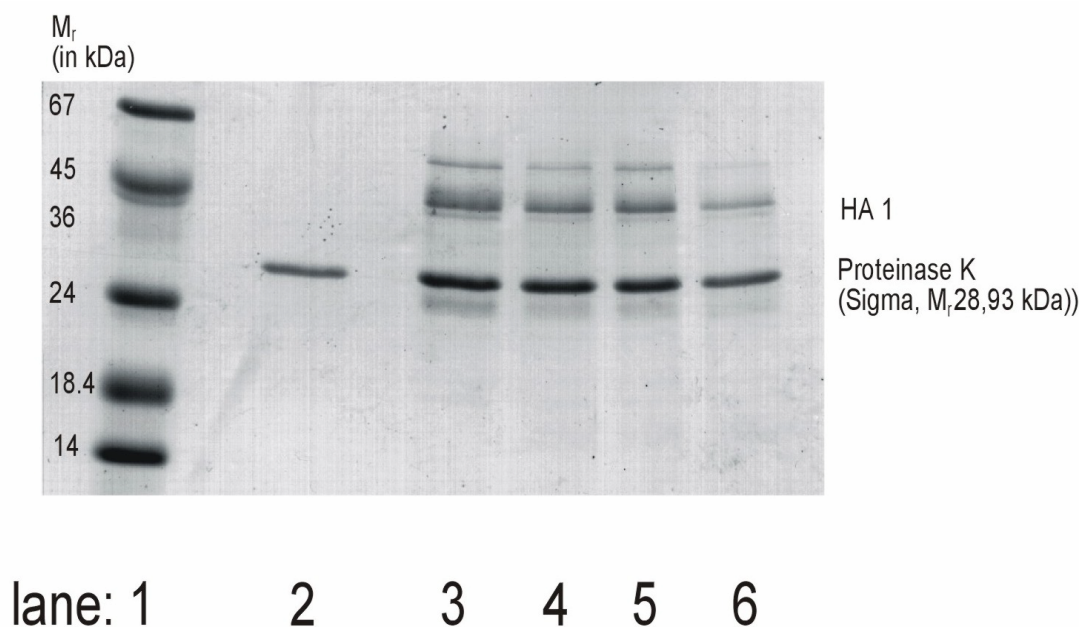


Abbildung 26

Einfluß der Vorinkubation bei niedrigem pH-Wert auf die Zugänglichkeit von Influenza A/Japan/305/57 auf die proteolytische Verdauung durch Proteinase K (SDS-PAGE-Gele gefärbt mit Coomassie-Blau)

Bahn 1: Molekulargewichtsmarker; Bahn 2: Proteinase K; Bahnen 3-6: Proteinase K-Verdau, Bahn 3: nach Vorinkubation für 10 min bei 37°C, pH 7,4; Bahn 4: nach Vorinkubation für 10 min bei 37°C, pH 5,0; Bahn 5: nach Vorinkubation für 10 min bei 4°C, pH 5,0; Bahn 6: nach Vorinkubation für 120 min bei 37°C, pH 5,0

Interessanterweise zeigte HA auch nach 10 min Vorinkubation bei pH 5,0, 37°C, also unter den optimalen Bedingungen und nach einem Zeitraum, in dem die Fusion schon abgelaufen ist, kaum Verdaubarkeit durch Proteinase K. Nach 120 min Vorinkubation bei pH 5,0, 37°C, also unter Bedingungen, wo auch Influenza des Stammes A/Japan/305/57 inaktiviert ist (siehe auch Korte et al., 1997), war HA1 fast vollständig durch Proteinase K verdaut.

Wenngleich also die Proteolyse von HA durch Proteinase K ungeeignet ist, den Anteil der HA-Trimere, die in eine fusionskompetente Konformation übergehen, zu quantifizieren, liefert sie doch einen deutlichen Hinweis, daß diese Struktur wahrscheinlich (im Gegensatz zur inaktivierten Struktur) wenig verschieden von der neutralen Struktur des HA zu sein scheint!

5.2. 3D-Rekonstruktion von HA unter verschiedenen Bedingungen

Wie bereits in der Einleitung ausgeführt wurde, gibt es in der Literatur keinen einzigen Hinweis auf eine erfolgreiche Kristallzüchtung des HA bzw. BHA - vermutlich wegen der Exponierung hydrophober Sequenzen. Wir haben die 3D-Strukturen des HA von Influenza A/Japan/305/57 (H2N2) unter drei verschiedenen Bedingungen untersucht: (1.) pH-Wert 7,4; (2.) pH-Wert 5,0, 4°C; (3.) pH-Wert 5,0, 37°C für 10 Minuten. Im folgenden sollen unser Ansatz der Strukturaufklärung mit der Einzelpartikelmethode der Elektronenmikroskopie am Beispiel des HA bei pH 5,0, 37°C (die Untersuchungen an den Strukturen bei pH 7,4 und pH 5,0, 4°C erfolgten in enger Zusammenarbeit mit Holger Stark (jetzt Universität Marburg) aus der Gruppe von Marin van Heel (jetzt Imperial College London), der trotz seiner Arbeit an Ribosomen-Strukturen Zeit fand, seine Erfahrungen für die 3D-Rekonstruktion des HA einzusetzen und dem ich schon an dieser Stelle ganz herzlich danken möchte!) und parallel dazu die damit gewonnenen Ergebnisse für alle drei Zustände des HA unter vorgenannten Bedingungen vorgestellt werden.

Nachdem die Negative mittels eines linearen CCD-Scanners digitalisiert wurden (s. Material und Methoden), wurden diese ausschnittweise in starker Vergrößerung auf dem Bildschirm dargestellt und möglichst alle sich nicht überlappenden Moleküle interaktiv mit einem Cursor selektiert. Diese mit dem Cursor definierten Koordinaten dienten als Mittelpunkt für jeweils 80 x 80 Pixel große Einzelbilder, die extrahiert und zu einem Datensatz zusammengefaßt wurden.

Mit der Filterung der Bilder über einen “band-pass filter” wurden sehr hohe Ortsfrequenzen, die vornehmlich Rauschen repräsentieren, und sehr niedrige Ortsfrequenzen, die sehr “grobe” Strukturen entsprechen, abgeschnitten. Da die Kryo-Technik, wie bereits beschrieben, mit Schwermetallkontrastierung kombiniert wurde, um kontrastreiche Aufnahmen nahe am Fokus zu erhalten, war die Wahl geeigneter Filterparameter - insbesondere für das Entfernen der unerwünschten niedrigen Ortsfrequenzen, die u.a. die Kontrastmittelverteilung beschreiben - von besonders großer Bedeutung. Auf die Wahl der Filterparameter reagierte die nachfolgende Ausrichtung der Einzelpartikel außerordentlich sensibel!

Zusätzlich wurden die Einzelbilder mit einer Kreismaske von einem Durchmesser von 80 Pixeln

umgeben, außerhalb derer alle Helligkeitswerte auf Null gesetzt wurden und die Helligkeit innerhalb dieser Maske wurde für jedes Bild normiert (siehe Grundlagen der Bildverarbeitung). Das Ergebnis dieser Prozeduren für 10 Einzelbilder zeigt Abbildung 27.

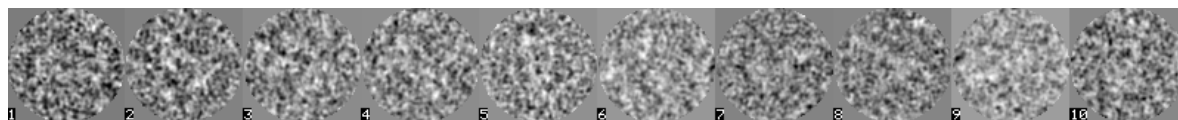


Abbildung 27 10 Einzelbilder nach Filterung und Normierung und mit Kreismaske versehen.

Zur Ausrichtung als Voraussetzung für die Bildmittelung und damit für eine erhöhte Auflösung sind (wie in “Grundlagen der Einzelpartikelmethode” beschrieben) Referenzen erforderlich. Solche Referenzen liegen am Anfang des Bildverarbeitungsprozesses natürlich noch nicht vor. Es existiert aber auch die Möglichkeit einer referenzfreien Ausrichtung. Dazu wird die Totalsumme des Datensatzes “rotationsverschmiert”. Damit erhält man eine relativ gute Referenz zur translationalen Zentrierung des Datensatzes. Danach können “Multivariate statistische Klassifizierungstechniken” (siehe Grundlagen) benutzt werden, um ähnliche Bilder in ähnlichen Rotationsorientierungen zu finden und zu mitteln. Diese dienen dann als Referenzen für das “Multi-Referenz-Alignement” (MRA). Auf diese Weise kann auch vermieden werden, daß durch die Wahl (extrem) falscher Referenzen eine im Datensatz gar nicht vorhandene Information durch die falsche Ausrichtung gewissermaßen “hineingetragen” wird. Dies ist vor allem dann wichtig, wenn kaum Informationen über das Untersuchungsobjekt vorliegen.

Wir waren im Falle des HA in der glücklichen Lage, eine ganze Reihe von Informationen aus Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zu besitzen, wie zum Beispiel Molekulargewicht, Quartärstruktur, ungefähre Abmessungen und -im Falle der Struktur bei neutralem pH-Wert- sogar eine hochaufgelöste 3D-Struktur, wenn auch für ein enzymatisch abgespaltenes HA eines anderen Stammes (X-31), der darüber hinaus einem anderen HA-Subtyp (H3) angehört.

Diese Vorkenntnisse ermöglichten die Auswahl einer “typischen” und gut zentrierten Ansicht,

um sie als erste Referenz zu benutzen. Durch die nachfolgende iterative Anwendung von MSA-Klassifizierung und erneuter Ausrichtung an den jeweils erhaltenen neuen Referenzbildern setzt sich schließlich die tatsächlich im Datensatz enthaltene Information durch und die Klassensummen stabilisieren sich. Abbildung 28 A zeigt die ausgerichteten Bilder aus Abbildung 27 und die Totalsumme dieser 10 Bilder (Abbildung 28 B) mit deutlich erhöhtem Informationsgehalt.

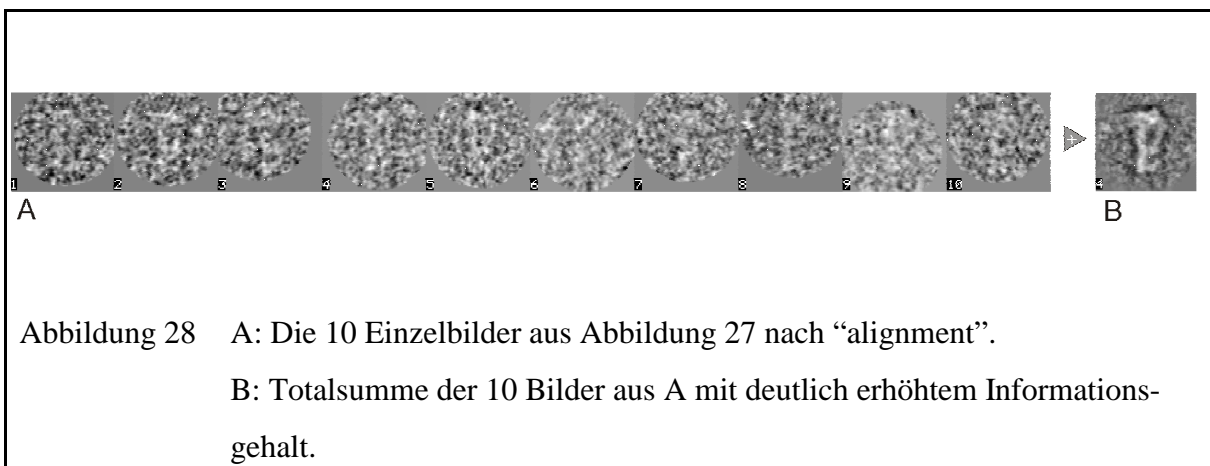


Abbildung 28 A: Die 10 Einzelbilder aus Abbildung 27 nach “alignment”.

B: Totalsumme der 10 Bilder aus A mit deutlich erhöhtem Informationsgehalt.

Um auch ohne Zuhilfenahme von Kippserien und der damit verbundenen höheren Strahlenbelastung eine dreidimensionale Rekonstruktion des HA aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen vornehmen zu können, darf das HA im Präparat nicht nur einige wenige bevorzugte Orientierungen einnehmen, sondern es sollte einen weiten Bereich charakteristischer Projektionen liefern. Im Ergebnis der Präparation nach Doms et al. (1985) (siehe Material und Methoden) erhielten wir rosettenförmige Assoziate des HA mit unterschiedlicher Besetzungsdichte. Um weder eine zu geringe Besetzungsdichte (und damit u.U. eine zu geringe Repräsentanz bestimmter Raumwinkel) noch eine zu hohe Besetzungsdichte und damit teilweise sich überlappende HA-Trimere zu erhalten, haben wir die Dialysezeit verschieden lange variiert. Als optimal hat sich ein Besetzungsgrad von 3 bis 10 HA-Trimeren erwiesen, der sich bevorzugt nach einer Dialyse-Zeit von 30 min (ohne Pufferwechsel) einstellt.

Abbildung 29 zeigt die rosettenförmigen Assoziate der HA-Trimere unter den verschiedenen Untersuchungsbedingungen.

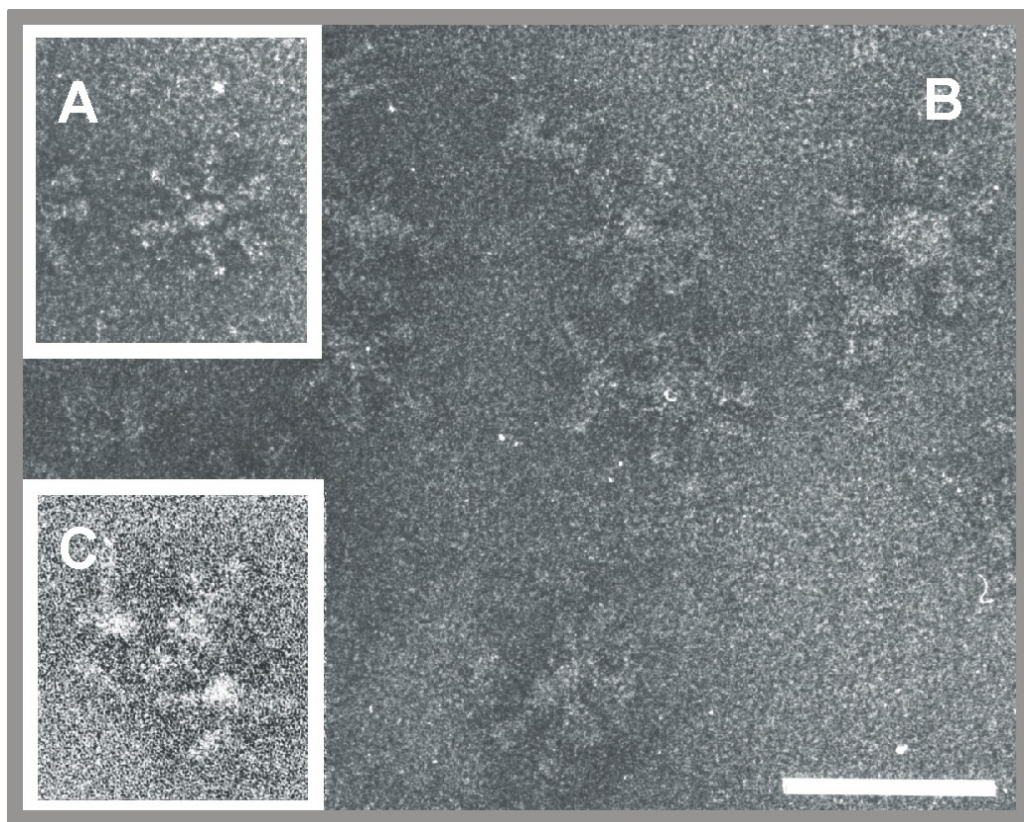


Abbildung 29 “Rosetten” aus HA-Trimere unter den verschiedenen Untersuchungsbedingungen:
 A: pH 5,0, 4°C, B: pH 7,4, C: pH 5,0, 37°C
 (Der Balken entspricht 100 nm)

Trotzdem war nicht klar, ob die charakteristischen Lagen, welche die HA-Trimere im Eis einnehmen, einer zufälligen Verteilung aller Eulerwinkel entsprechen würde. Letzteres ist aber zur Berechnung einer 3D-Struktur mit isotroper Auflösung wünschenswert.

In Abbildung 30 ist die Winkelverteilung beispielhaft für die Klassensummen, die zur Berechnung einer 3D-Struktur verwendet wurden, angegeben. Der Anschaulichkeit halber ist die Aufsicht der gesamten Eulerkugel (Gamma von 0 bis 360°) dargestellt. Dabei muß beachtet werden, daß aufgrund der C3-Symmetrie des HA jede verwendete Projektion drei Punkte an der Oberfläche der Eulerkugel erzeugt, welche jeweils die gleiche charakteristische Lage des HA im Raum beschreiben. Da es sich bei den Winkelangaben um relative Orientierungen der

Projektionen zueinander handelt, sind zusätzlich zur Veranschaulichung der Bedeutung der Winkel die Oberflächenbilder der 3D-Struktur des HA für $\gamma=20^\circ$, 60° und 100° bei jeweils $\beta=90^\circ$ dargestellt.

Es ist ersichtlich, daß die Projektionen einen weiten Winkelbereich abdecken. Trotzdem gibt es bevorzugte Orientierungen im Präparat, besonders hinsichtlich γ (zur Definition der Eulerwinkel siehe Abbildung 14 in Grundlagen). So scheint z.B. der Winkel um $\gamma=100^\circ$ relativ selten eingenommen zu werden. Trotzdem ist gut erkennbar, daß die Projektionswinkelverteilung recht homogen ist, d.h. es stehen genügend Projektionen in verschiedenen Orientierungen zur Berechnung einer 3D-Struktur mit isotroper Auflösung zur Verfügung.

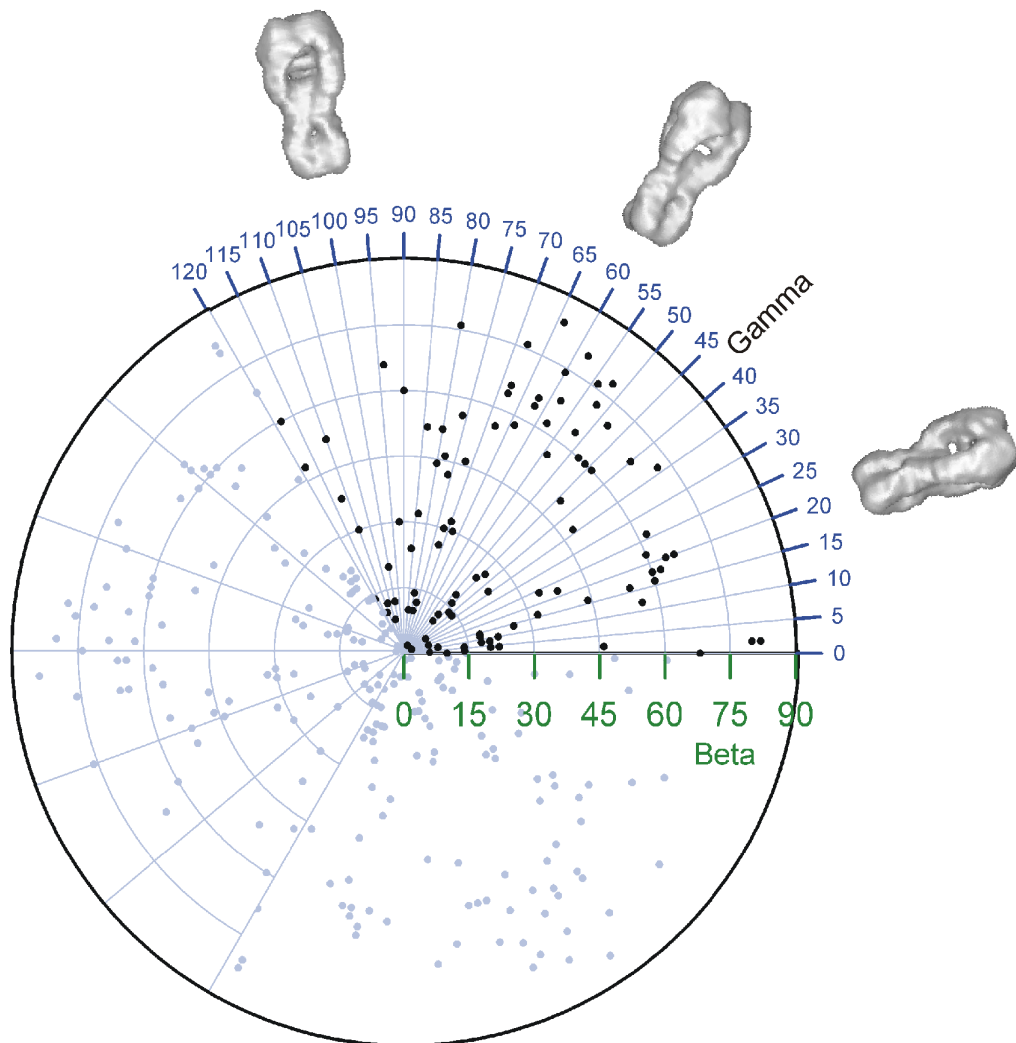


Abbildung 30 Winkelverteilung für die Klassensummen, die zur Berechnung einer 3D-Struktur verwendet wurden. Es ist die Aufsicht der gesamten Eulerkugel (Gamma von 0 bis 360°) dargestellt, aufgrund der C3-Symmetrie des HA erzeugt jede verwendete Projektion drei Punkte an der Oberfläche der Eulerkugel, welche jeweils die gleiche charakteristische Lage des HA im Raum beschreiben. Zusätzlich sind zur Veranschaulichung der Bedeutung der Winkel die Oberflächenbilder der 3D-Struktur des HA für $\gamma=20^\circ$, 60° und 100° bei jeweils $\beta=90^\circ$ dargestellt.

Klassensummen, also Totalsummen von Einzelbildern, die die gleiche charakteristische Projektion des HA repräsentieren, sind das Ergebnis der iterativen Anwendung von MSA und MRA (siehe Grundlagen). Für die Berechnung der 3D-Struktur ist es notwendig, die Winkelbeziehungen dieser Klassensummen zueinander per “angular reconstitution” zu berechnen. Dafür müssen die Klassensummen aber exakt zentriert sein.

Dazu wurde zunächst aus drei sehr verschiedenen Klassensummen eine erste grobe 3D-Struktur berechnet. Dann wurde unter Berücksichtigung der C3-Symmetrie von Hand eine Datei mit Eulerwinkeln erstellt, deren Werte einer möglichst homogenen Winkelverteilung in der Eulerkugel entsprachen. Die ermittelte erste 3D-Struktur wurde daraufhin in Richtung dieser Winkel ausprojiziert. Diese sogenannten “forward projections” dienten als neue Referenzen für ein “Multi-Referenz-Alignment” (MRA) des Datensatzes, was zu einer besseren Zentrierung der nächsten Klassensummen führte. Damit war nun eine exaktere Winkelbestimmung der Klassensummen zueinander möglich, was wiederum zu einer verbesserten 3D-Struktur und damit zu besseren “forward projections” als neue Referenzen führte.

Dieses Verfahren wurde so fortgeführt, wobei ab einem bestimmten Punkt die Teilung des Datensatzes bezüglich des Eulerwinkels β (also in stark und weniger stark gekippte Klassensummen resp. Projektionen) und deren Ausrichtung mittels MRA mit entsprechend modifizierten “forward projections” als Referenzen zu noch besseren Ergebnissen führte.

Der eben erläuterte iterative Prozeß trug der wechselseitigen Abhängigkeit von Winkelzuordnungen zu den Projektionen und damit der 3D-Struktur einerseits und exakter Zentrierung der Projektionen andererseits Rechnung und verbesserte zunehmend die 3D-Struktur.

Um die Zentrierung der Projektionsbilder bezüglich der 3D-Struktur noch weiter zu verbessern, wurden gleichzeitig mit jeder neuen 3D-Struktur Rückprojektionen (“filtered back projections”, siehe Grundlagen) in Richtung der für die Klassensummen ermittelten Eulerwinkel errechnet. Diese Rückprojektionen konnten als Referenzen für eine Nachjustierung der Klassensummen bezüglich der 3D benutzt werden. Die Vorwärtsprojektionen der aus diesen nachjustierten Klassensummen errechneten 3D-Struktur dienten dann als (besser zentrierte) Referenzen für das MRA.

Abbildung 31, Spalte A zeigt einige Einzelbilder nach Filterung und Normierung. Spalte B zeigt

dieselben Einzelbilder nach Alignierung und in Spalte C sind die Klassensummen (oder “charakteristischen Projektionen”) dargestellt.

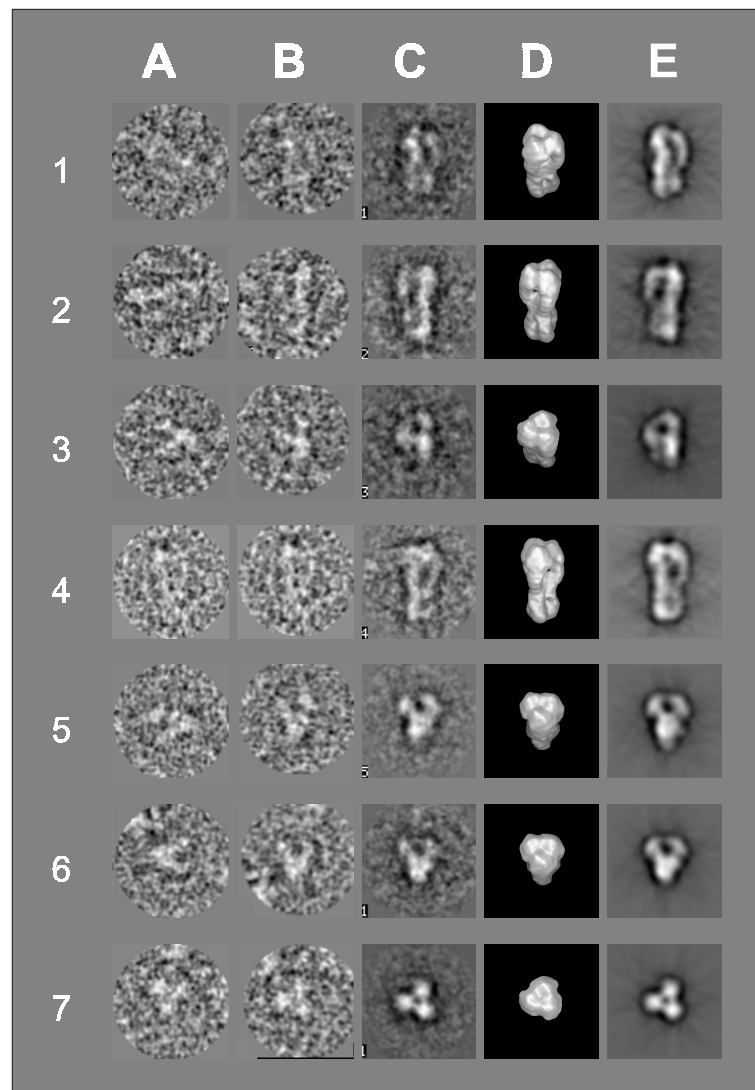


Abbildung 31 Spalte A: Einzelbilder nach Filterung, Normierung
 Spalte B: dieselben Einzelbilder nach Alignierung
 Spalte C: Klassensummen (oder “charakteristischen Projektionen”)
 Spalte D: Oberflächenansichten der 3D-Struktur (Winkel entsprechend C)
 Spalte E: entsprechende Rückprojektionen

Die aus solchen Klassensummen berechneten 3D-Strukturen wurden solange über “refinement-

Prozeduren” verbessert, bis sich die 3D-Struktur stabilisiert hatte. Dazu wurde vor allem das “anchor-set refinement” eingesetzt. Das bedeutet, daß die relative Winkelzuordnung der Klassensummen nicht nur, wie in “Grundlagen” beschrieben, über die Sinogramm-Korrelation der Klassensummenbilder untereinander ermittelt wurden, sondern daß zunächst Sinogramme von Rückprojektionen der 3D-Struktur berechnet wurden. Solche in vorgegebenen Winkeln errechneten Rückprojektionen haben untereinander eindeutig definierte Winkelbeziehungen. Diese wurden benutzt, um über Sinogramm-Korrelationen eine erneute Winkelzuordnung zu den Klassensummen vorzunehmen. Damit konnte der Einfluß schlecht zentrierter Klassensummen sukzessive eliminiert und die 3D-Struktur im Raum stabilisiert werden.

Die erhaltenen 3D-Strukturen liegen im Ergebnis der Berechnung als Schnittbilder vor. Da diese Form der Darstellung wenig anschaulich ist, werden hier die Oberflächenbilder der 3D-Struktur dargestellt. (Der Nachteil dieser Darstellung ist, daß die (vorhandene!) Information über die innere Elektronendichte des Moleküls verborgen bleibt.)

Abbildung 31, Spalte D zeigt solche Oberflächenansichten der 3D-Struktur, die Winkel entsprechen denen der Klassensummen aus Spalte C. In Spalte E sind die entsprechenden Rückprojektionen dargestellt.

5.2.1. 3D-Struktur des HA bei neutralem pH-Wert

Abbildung 32 zeigt die nicht-fusionsaktive 3D-Struktur von Hämagglutinin des Stammes Influenza A/Japan/305/57 (H2-Subtyp) bei neutralem pH-Wert. Es ist die *erste* dreidimensionale Struktur von HA eines *weiteren* Influenza-Stammes (nach X-31) und es ist die *erste* 3D-Struktur eines *intakten* und *vollständigen* HA, d.h. HA wurde nicht enzymatisch vorbehandelt.

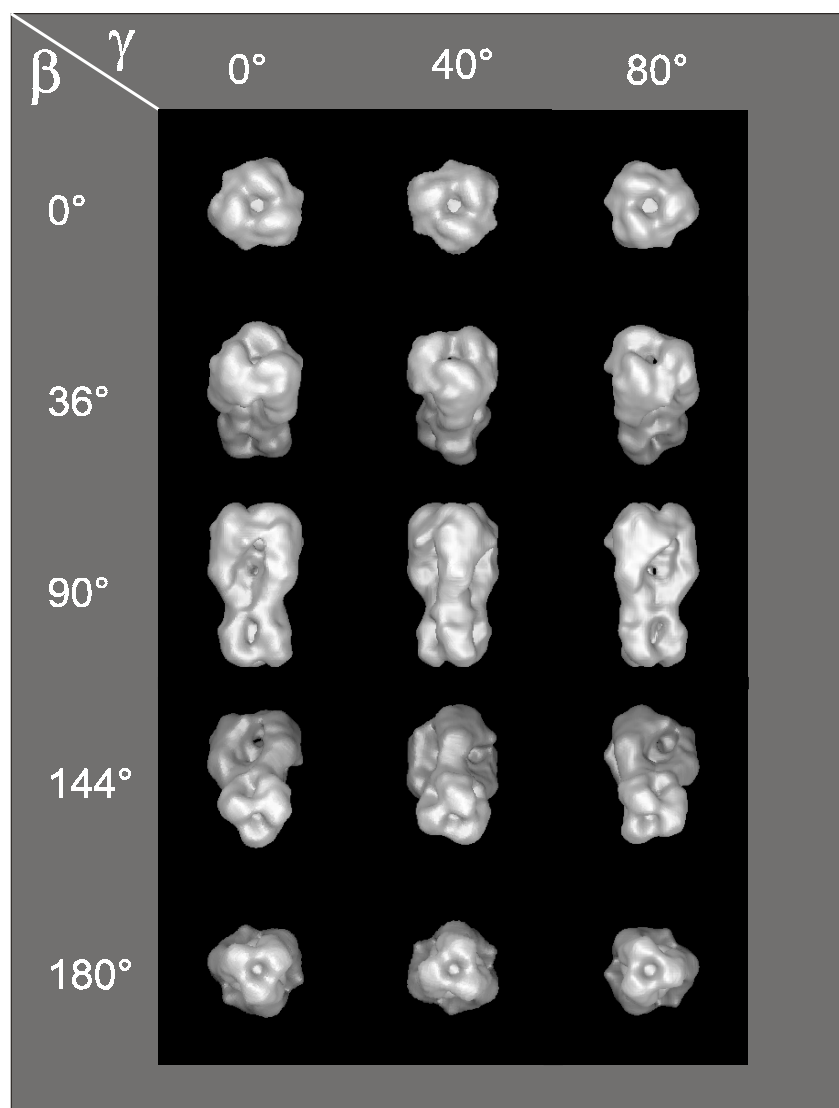


Abbildung 32

Oberflächenansichten der nicht-fusionsaktiven 3D-Struktur von Hämagglutinin des Stammes Influenza A/Japan/305/57 (H2-Subtyp) bei neutralem pH-Wert

Die erreichte Auflösung von 10 Å (es wurden 2928 Trimere verwendet) stellt eine für die 3D-Elektronenmikroskopie sehr gute Auflösung dar, besonders unter Berücksichtigung der Größe des HA-Trimers und der Verwendung eines konventionellen Elektronenmikroskopes (Philips CM12 mit gewöhnlicher Haarnadelkathode), und spricht für die Probenpräparation sowie für die verwendete Kombination aus Kontrastierung und Kryo-Technik. Letztere erlaubte Aufnahmen nahe am Fokus, was von der Notwendigkeit entthob, Phasenumkehrungen in der Phasen-Kontrast-Übertragungsfunktion (PCTF) zu korrigieren². Obwohl die transmembranale sowie die intravirale Domäne anwesend waren, sind sie durch die sie umgebenden Lipidreste, welche den Mittelpunkt der HA-Rosetten bilden, nicht aufzulösen. Die virale Membran wäre circa 18 Å vom proximalen Ende des HA-Trimers entfernt, die dargestellte Struktur entspricht also weitgehend der Ektodomäne des HA.

Wie ein Vergleich mit der bekannten Röntgenstruktur des Stammes Influenza X-31 [Wilson et al., 1981] zeigt, sind die Unterschiede (im Rahmen der erreichten Auflösung) eher gering (siehe Abschnitt 6.1. und Abbildung 36 in "Diskussion"). Der Vergleich mit der Röntgenstruktur des Stammes X-31 läßt mehrere wichtige Schlüsse zu:

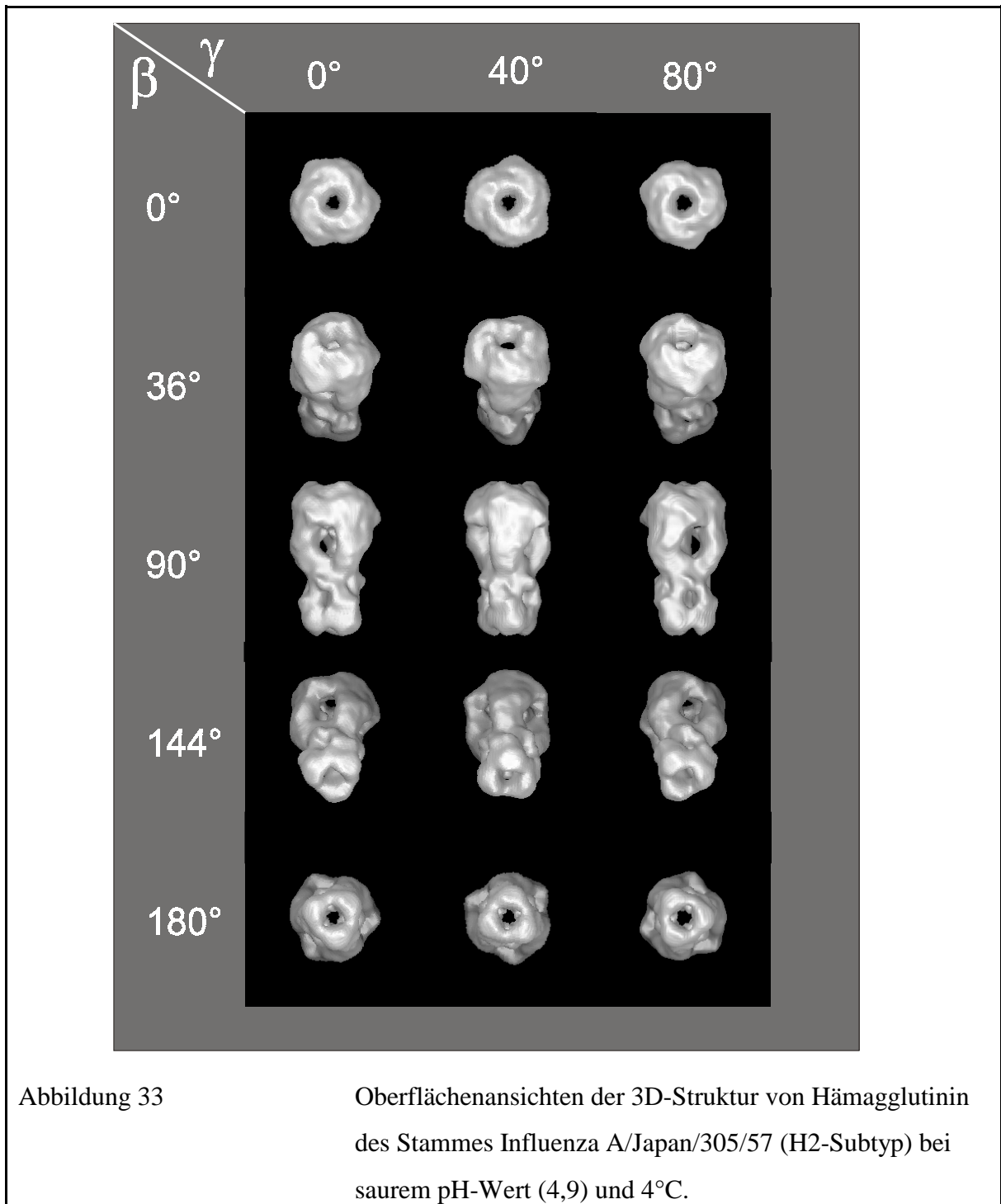
1. Die nicht-fusionsaktive (neutrale) 3D-Struktur der HA Ektodomäne von Influenza A-Viren X31 und A/Japan sind sehr ähnlich, obwohl das HA von X31 und A/Japan zwei verschiedenen serologischen Subtypen angehört (X31 = (H3); A/Japan= (H2)), d.h. das HA dieser Stämme unterscheidet sich in mindestens 30% der Aminosäuresequenz. Dennoch ist die 3D-Struktur sehr ähnlich, was auf deren funktionale Bedeutsamkeit hinweist!
2. Es wird damit bestätigt, daß die Abtrennung der transmembranalen sowie der intraviralen Domäne durch Bromelain (für die Kristallzüchtung notwendig!) die Struktur der HA-Ektodomäne bei neutralem pH Wert nicht beeinflußt.

² Da elektronenmikroskopische Bilder biologische Objekte geringen Kontrast zeigen, wird in der Praxis meist stark defokussiert, um die niedrigen Raumfrequenzen stärker zu übertragen und damit den Kontrast zu erhöhen. Dabei treten aber auch vermehrt Phasenumkehrungen in der PCTF auf, die im Rahmen der Bildverarbeitung zu korrigieren sind.

3. Die Präparationsstrategie und das methodische Vorgehen sind offensichtlich geeignet, die dreidimensionale Struktur von Proteinen zu untersuchen und sollten auch zur Strukturbestimmung unterschiedlicher konformerer Zustände bei Bedingungen, unter denen Proteine nicht der Kristallisation zugänglich sind, verwendbar sein.

5.2.2. 3D-Struktur des HA bei saurem pH-Wert und 4°C

Abbildung 33 zeigt die 3D-Struktur von Hämagglutinin des Stammes Influenza A/Japan/305/57 (H2-Subtyp) bei saurem pH-Wert (4,9) und 4°C.



Wie in Abschnitt “Fusions- und Inaktivierungsverhalten” dargestellt, vermittelt HA des Stammes A/Japan unter diesen pH-Bedingungen schon Fusion, während keinerlei Inaktivierung zu beobachten ist.

Es handelt sich bei dieser Struktur um die *erste* 3D-Struktur des intakten Hämagglutinin bei saurem pH-Wert. Die Auflösung beträgt 14 Å, es wurden 1833 Trimere verwendet.

Auffällig ist, daß sowohl die Monomere eng assoziiert bleiben als auch HA1 eng mit HA2 assoziiert bleibt.

Der in Abbildung 34 dargestellte Vergleich macht die wesentlichen Ergebnisse deutlich:

1. Die Hauptunterschiede (in Abbildung 34 mit Pfeilen markiert) sind:

- a) eine Abflachung der distalen Topregion jedes Monomers,
- b) eine Torsion der gesamten Ektodomäne des HA, vorwiegend im Bereich oberhalb der viralen Membran,
- c) eine Umfaltung der Stammregion des Trimers und
- d) die Bildung eines zentralen Kanals durch das gesamte Trimer.

2. Die Unterschiede zwischen den Strukturen von Influenza A/Japan bei pH 7,4 und bei pH 5,0 sind groß im Vergleich zu den Unterschieden zwischen der Struktur von Influenza A/Japan bei pH 7,4 und der Röntgenstruktur von Influenza X-31.

3. Da der Methodik der Bildverarbeitung die Homogenität des Datensatzes (also Isomorphie der Teilchen) inhärent ist, muß man davon ausgehen, daß nahezu alle HA-Trimere (im Rahmen der erhaltenen Auflösung, also in diesem Fall 14 Å) eine identische Struktur aufweisen. Da sich diese Struktur deutlich von der nicht-fusionsaktiven (neutralen) 3D-Struktur der HA Ektodomäne von Influenza A/Japan unterscheidet und unter den gewählten Bedingungen (pH 5,0; 37°C) schon Fusion, keinesfalls aber Inaktivierung auftritt, handelt es sich um eine fusionskompetente Konformation des HA, die innerhalb der “Fusionskaskade” der HA-vermittelten Fusion liegt.

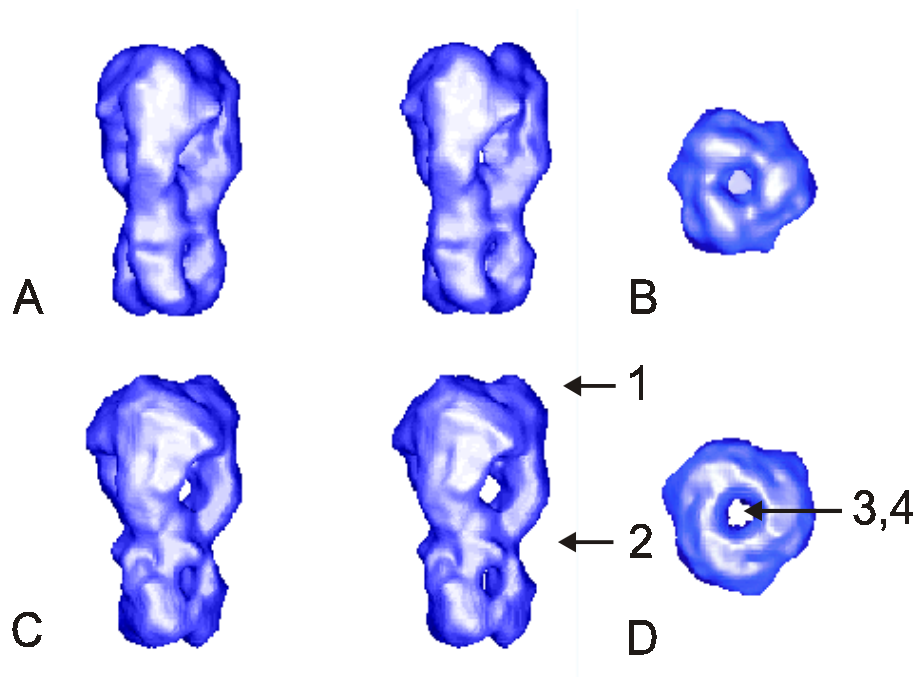
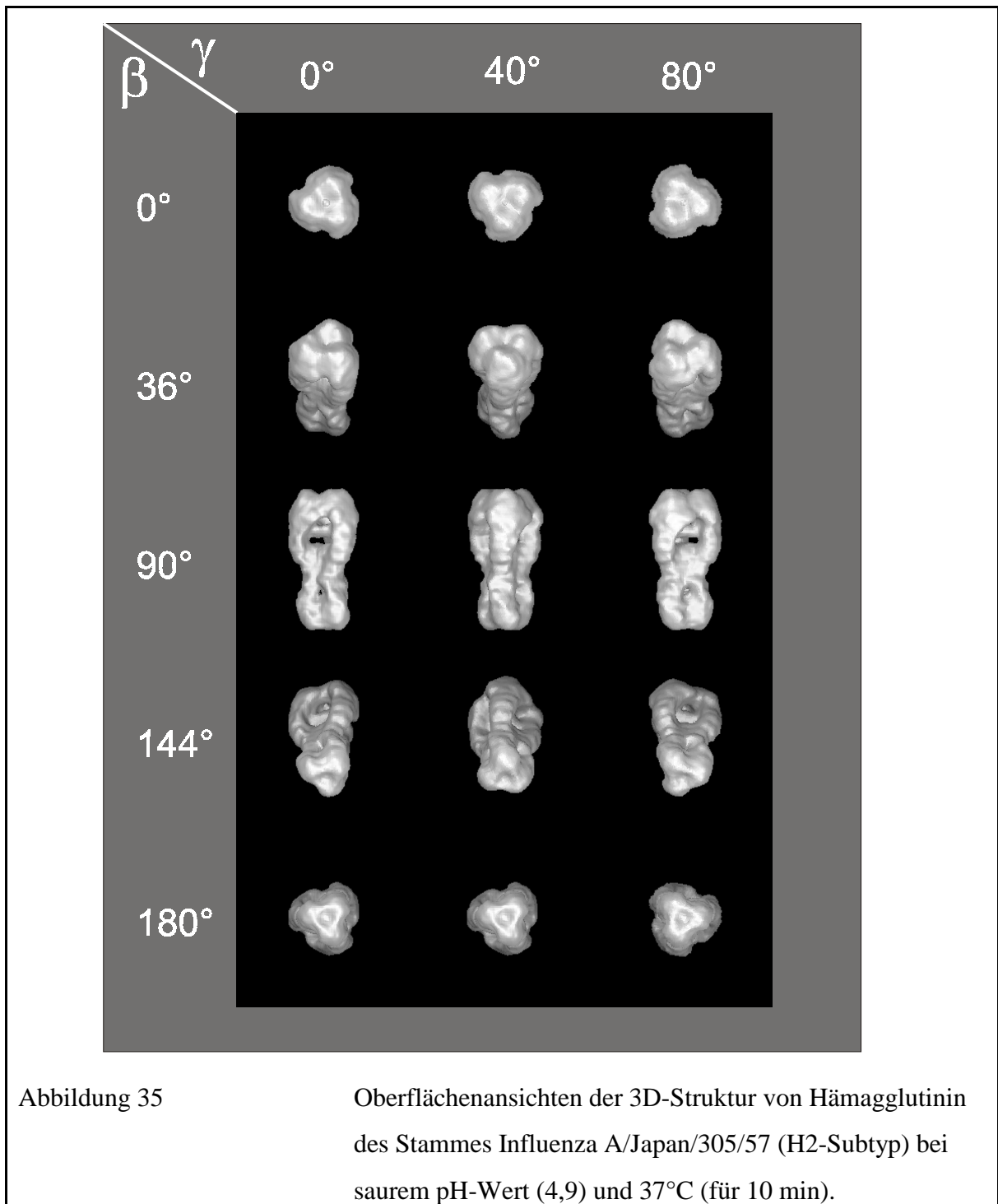


Abbildung 34 Vergleich der 3D-Strukturen von Hämagglutinin des Stammes Influenza A/Japan/305/57 (H2-Subtyp)
 A, B: bei neutralem pH-Wert und
 C, D: bei saurem pH-Wert und 4°C
 (A und C Stereodarstellung der Seitenansicht; B und D Draufsicht)

5.2.3. 3D-Struktur des HA bei saurem pH-Wert und 37°C

Abbildung 35 zeigt die 3D-Struktur von Hämagglutinin des Stammes Influenza A/Japan/305/57 (H2-Subtyp) bei saurem pH-Wert (4,9) und 37°C (für 10 min).



Die einzelnen Monomere wirken schlanker und die Struktur zeigt insgesamt eher Ähnlichkeit mit der 3D-Struktur bei neutralem pH-Wert, zudem ist die erzielte Auflösung deutlich geringer (17 Å bei ca. 1.000 verwendeten Trimeren).

Die möglichen Ursachen für dieses unerwartete Ergebnis werden im Diskussionsteil erörtert.

6. Diskussion

Im Rahmen der Diskussion sollen die rekonstruierten 3D-Strukturen näher betrachtet und deren Relevanz für bestehende Fusionsmodelle erörtert werden.

Ogleich noch keine Technik gefunden wurde, die die strukturellen Veränderungen des TBHA2 (also insbesondere die Bildung der “extended coiled-coil”-Struktur und den helix-turn-Übergang) der Fusionskinetik bzw. den entsprechenden Intermediaten des Fusionsprozesses direkt zuordnen kann, konnten wir durch die Aufnahme von CD-Kinetiken (283 nm) am isolierten HA zeigen, daß nach pH-Erniedrigung zwei deutlich verschiedene konformere Zustände des HA existieren. Der pH-Erniedrigung folgte zunächst eine schnelle (negative) Zunahme des CD-Signals. Dieser schnellen Erhöhung der CD-Amplitude (Halbwertszeit bei pH 5,0, 37°C ungefähr 30 s) folgte ein langsames kontinuierliches Abklingen des CD-Signals [Korte et al., 1997].

Die Charakteristik der CD-Kinetik der HA-Ektodomäne nach pH-Erniedrigung ähnelte in Abhängigkeit vom Influenzastamm und den gewählten Bedingungen (pH, Temperatur) stark dem Fusionsverhalten der entsprechenden Influenzaviren. Die Auswertung der CD-Kinetiken und deren Vergleich mit entsprechenden Fusionskinetiken legte nahe, daß

- 1.) die (schnelle) erste Phase mit einer fusionskompetenten Konformation des HA assoziiert ist, in der zwar eine Konformationsänderung abläuft, jedoch kein Verlust der strukturellen Organisation (Tertiär- und Quartärstruktur) des HA-Moleküls eintritt,
- 2.) die (langsame) zweite Phase eher mit einer (ungeordneteren) fusionsinaktiven Konformation des HA gleichzusetzen ist, während der die Mobilität aromatischer Seitenketten zunimmt.

Zwei Tatsachen sind im Zusammenhang mit der Zielsetzung der Arbeit, ein fusionskompetentes Intermediat von HA strukturell aufzuklären, besonders bedeutsam: Zum einen ließ sich die erste Phase durch niedrige Temperaturen oder einen weniger sauren pH-Wert stabilisieren, also unter Bedingungen, unter denen auch die Inaktivierung des HA gehemmt ist. Zum anderen war die zweite Phase bei Influenza A/Japan nicht nur besonders langsam, sondern auch teilweise reversibel.

Puri et al. (1990) zeigten an isolierten Virionen des Stammes A/Japan/305/57, daß eine

Inkubation bei niedrigem pH innerhalb des Zeitrahmens, in dem beim Vorhandensein von fusionsfähigen Membranen Fusion abläuft, zu keinen erkennbaren morphologischen Veränderungen am HA führte. Damit galt eigentlich das HA des Subtyps H2 gemeinhin als ungeeignet, um Konformationsänderungen zu untersuchen.

Jedoch vor allem die Tatsache, daß der Stamm A/Japan weitgehend resistent gegenüber Inaktivierung ist (keine signifikante Inaktivierung während der ersten 10-15 min bei niedrigem pH, [Korte, 1995], läßt aber gerade das HA dieses Stammes geeignet für eine Strukturuntersuchung erscheinen, die über die rein visuelle Einschätzung elektronenmikroskopischer Abbildungen hinausgeht.

6.1. Vergleich der neutralen 3D-Struktur des HA von Influenza X-31 mit der von Influenza A/Japan

Schon die Rekonstruktion der 3D-Struktur des HA bei neutralem pH-Wert konnte eine Reihe interessanter Fragen beantworten:

- 1.) Es stellte sich heraus, daß nicht nur die 3D-Elektronenmikroskopie zur Untersuchung dieses -für diese Methode (zur Zeit noch) relativ kleinen- Moleküls sehr gut geeignet ist, sondern auch die angewendete Präparationstechnik.
- 2.) Es wurde erstmals ein komplettes, nicht enzymatisch vorbehandeltes HA untersucht und damit gezeigt, daß die für Röntgenkristallstrukturanalyse notwendige Bromelainbehandlung keinen Einfluß auf die Struktur hat.
- 3.) Es wurde das HA eines weiteren Stammes, der einem anderen HA-Subtyp angehört, untersucht. Dies wäre natürlich auch mit der Röntgenkristallstrukturanalyse möglich, wäre aber angesichts des erforderlichen Aufwandes, der mit dieser Methode verbunden ist, kaum zu vertreten.

In Abbildung 36 ist ein Vergleich der 3D-Struktur, die aus kryo-elektronenmikroskopischen Bildern ermittelt wurde (A), mit der bereits bekannten Röntgenstruktur des Stammes Influenza X-31 [Wilson et al., 1981] (B) dargestellt. Dazu wurde die Röntgenstruktur "low-pass"-gefiltert, um eine vergleichbare Auflösung zu erreichen. Im Rahmen der erreichten Auflösung (10 Å) sind

die Unterschiede gering, obwohl sich die Aminosäuresequenz beider HA-Stämme stark voneinander unterscheidet.

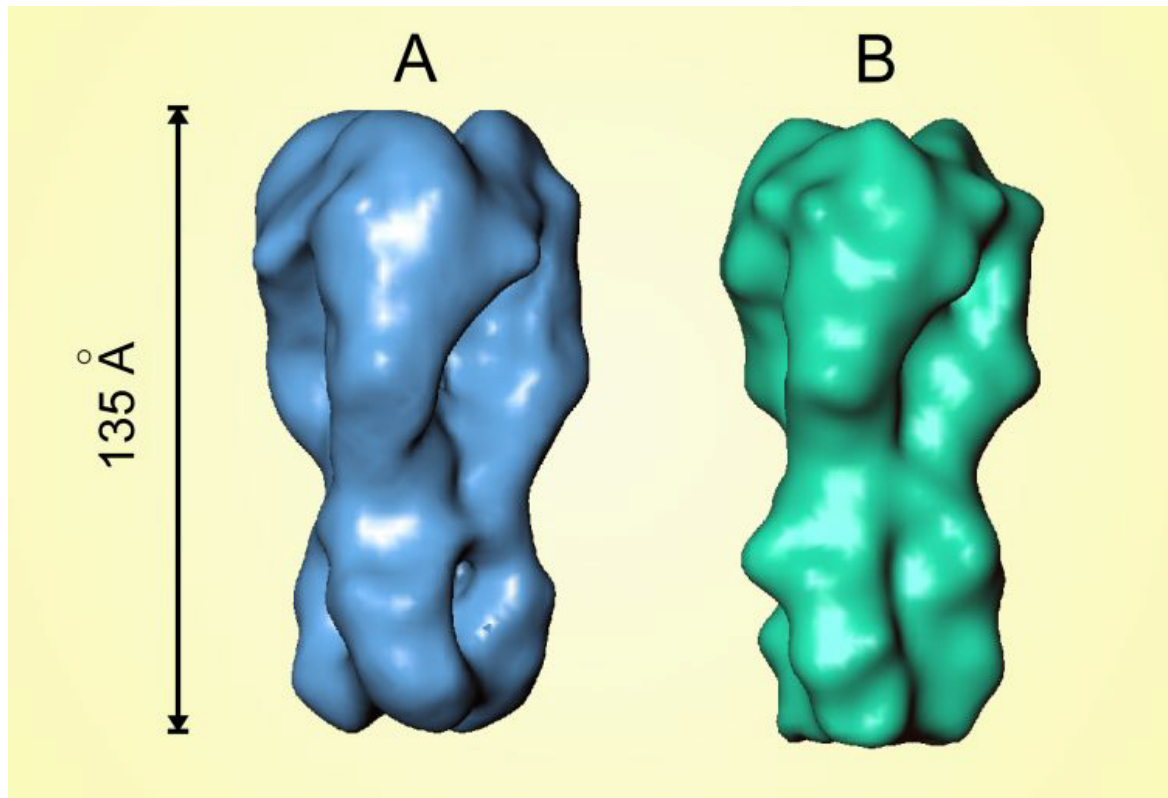


Abbildung 36

Vergleich der 3D-Struktur, die aus kryoelektronenmikroskopischen Bildern ermittelt wurde (A), mit der bereits bekannten Röntgenstruktur* des Stammes Influenza X-31 [Wilson et al., 1981] (B). Abbildung erstellt von H. Stark.

*"low-pass"-gefiltert, um eine vergleichbare Auflösung zu erreichen

Um Unterschiede in der Primärsequenz interpretieren zu können, wurden den Aminosäuren entsprechend ihrer Eigenschaften (Polarität und Größe der Seitenketten) Farben zugeordnet (Abbildung 37).

Dann wurden die Primärsequenzen (aus der genomischen RNA stammend [Gething et al., 1980], jeweils *ohne* Signalsequenz dargestellt) gegenübergestellt. Um nicht nur die globale Übereinstimmung zu beurteilen, sondern auch lokale Übereinstimmungen zu finden, wurden beide Sequenzen zuvor einem “pairwise sequence alignment” unterzogen. Dazu wurde “lalign” (GeneStream, <http://vega.igh.cnrs.fr>) benutzt. “Lalign” ermittelte für einen 324-Aminosäuren-overlap 36,7% Identität (zum Vergleich: für HA2 ergaben sich - ohne Einschub von “gaps”(!) - 54,7% für einen 179-Aminosäuren-overlap). Abbildung 38 zeigt, daß sich die Primärsequenzen vom HA1 der beiden Stämme jeweils auch hinsichtlich der Eigenschaften der Aminosäuren relativ stark unterscheiden.

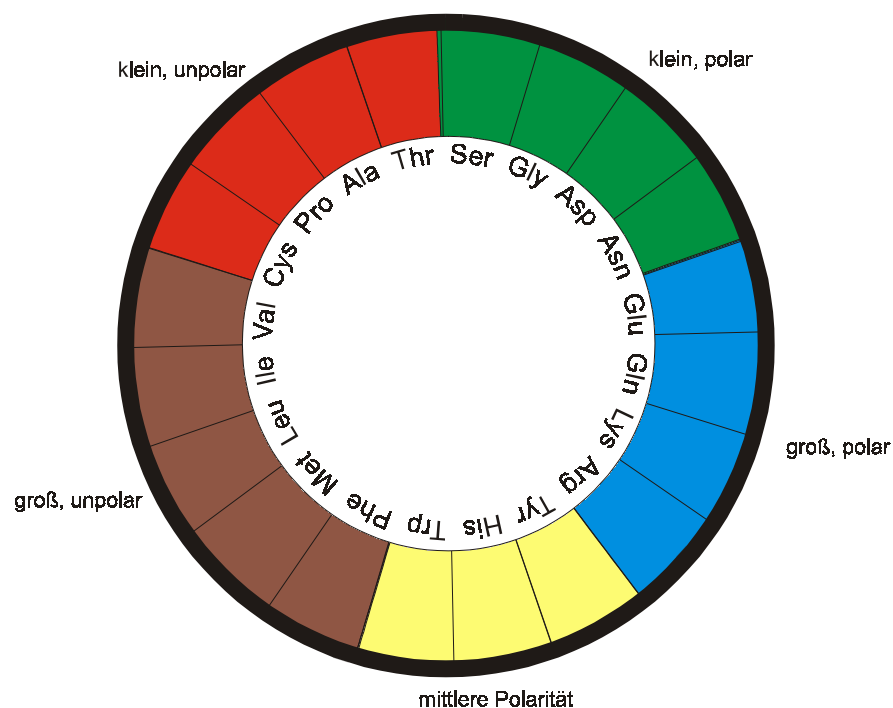


Abbildung 37

In den Abbildungen 38 bzw. 39 verwendete Farbzunordnung entsprechend den Eigenschaften (Polarität und Größe der Seitenketten) der jeweiligen Aminosäuren

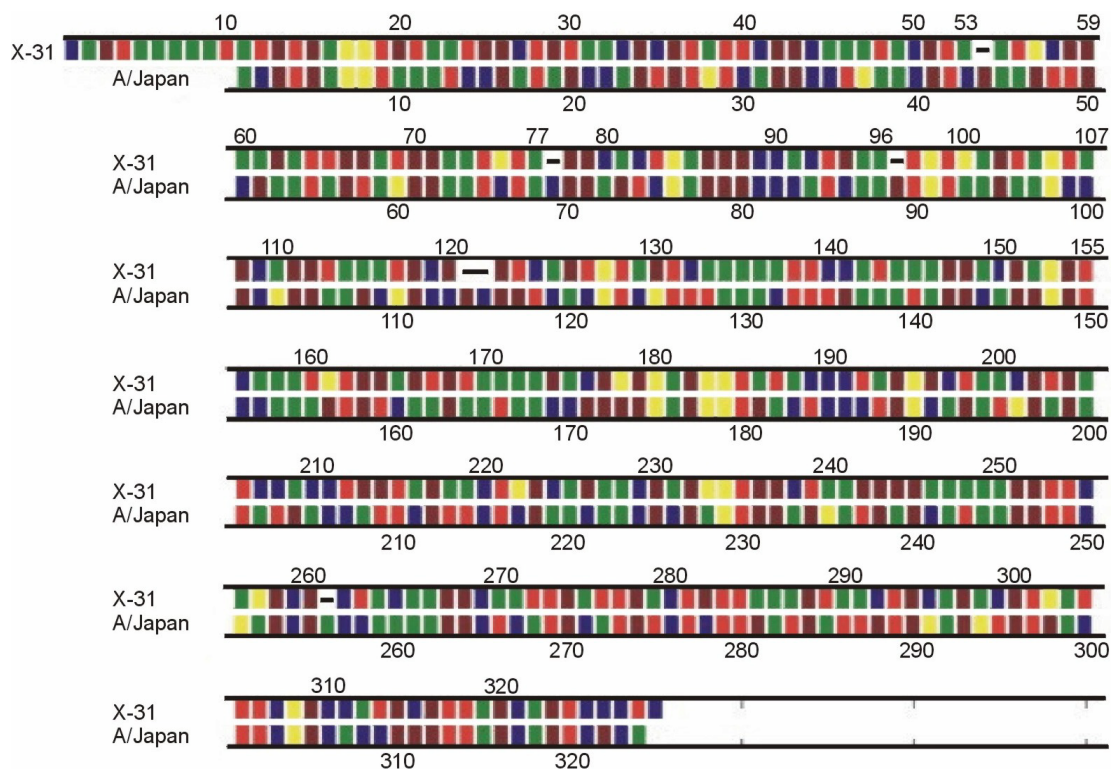


Abbildung 38 Vergleich der Primärsequenz des HA1 von X-31 und A/Japan entsprechend den Eigenschaften der Aminosäuren, Bedeutung der Farben s. Abbildung 37

Beim HA2 ähneln sich die Primärsequenzen der beiden Stämme hinsichtlich ihrer Eigenschaften sehr stark, versetzt man noch die Aminosäuren von A/Japan um lediglich eine Position “nach vorn”, ergibt sich eine ausgezeichnete Übereinstimmung (Abbildung 39).

Während in den meisten existierenden Fusionsmodellen dem HA1 nur eine Bedeutung für die Bindung an die Zielmembran der Fusion zugeschrieben wird, kommt dem HA2 der hervorragende Anteil beim Fusionsmechanismus zu. Die in Abbildung 39 ablesbare gute Übereinstimmung der Primärsequenz unterstreicht die funktionelle Bedeutung des HA2. Die (wenigen) Unterschiede im HA2 der beiden Stämme sind in Abbildung 40 hervorgehoben.

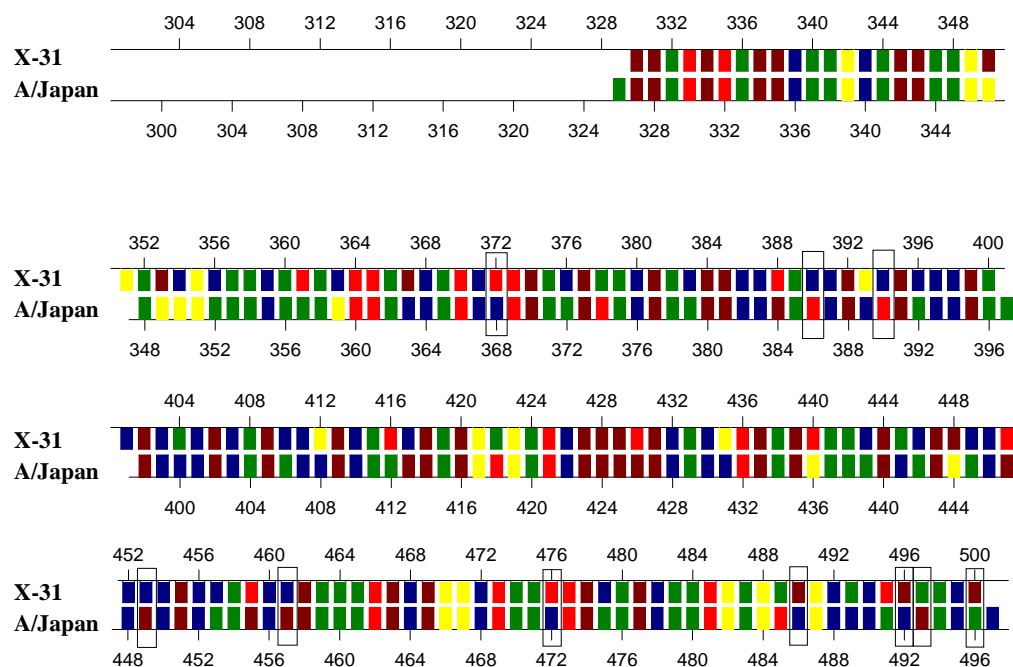


Abbildung 39 Vergleich der Primärsequenz der Ektodomänen des HA2 von X-31 und A/Japan entsprechend den Eigenschaften der Aminosäuren (Polarität und Größe der Seitenketten), Bedeutung der Farben s. Abbildung 37

Es handelt sich um Aminosäuren, die sich in Abbildung 37 gegenüberliegen, sich also durch sehr verschiedene Eigenschaften auszeichnen. Besonders die Positionen 43, 61 und 65 (entspricht 372, 390 und 394 in Abbildung 39) von X-31 scheinen in diesem Zusammenhang interessant, da sie sich in der coiled-coil-Region befinden, die für den “spring loaded mechanism” der Konformationsänderung bedeutsam ist [Carr and Kim, 1993]. Trotz vieler Hinweise auf die Relevanz dieses Mechanismus für den Fusionsprozeß bleibt offen, ob es sich bei dieser Struktur um eine Voraussetzung für die Fusion, also eine Art “Precursor” handelt, ob diese Konformation im Laufe der Fusion eingenommen wird (und wenn ja, wann) oder ob es sich um eine postfusogene Konformation handelt.

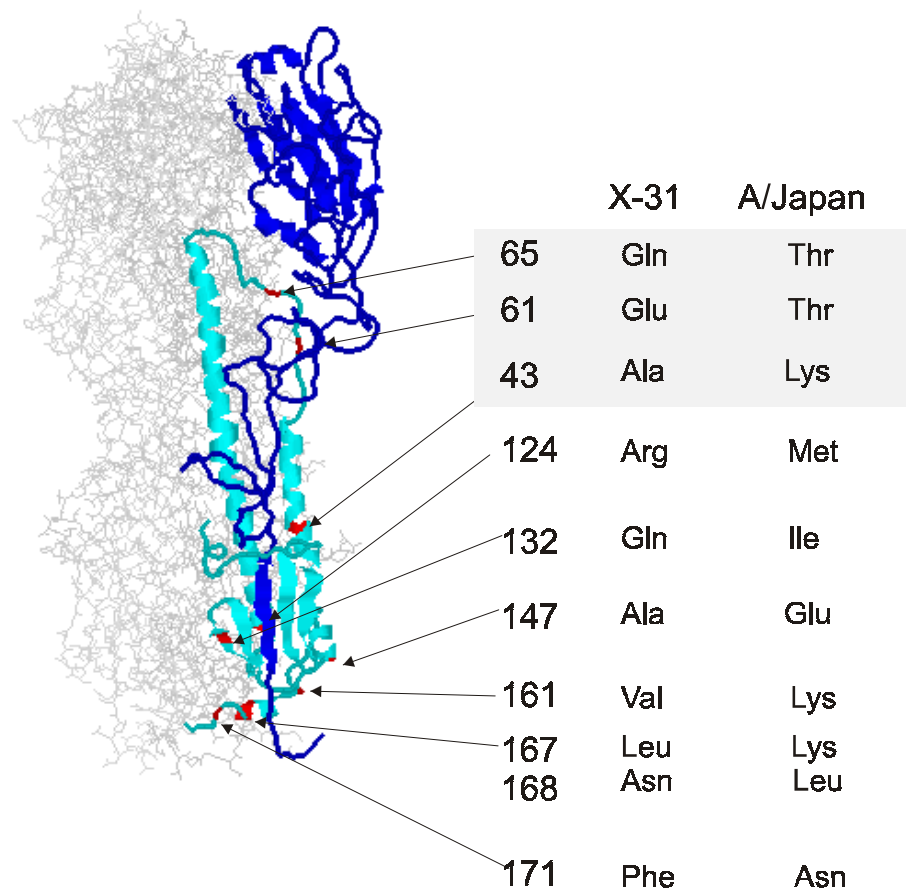


Abbildung 40 Aminosäuren mit stark unterschiedlichen Eigenschaften in der Primärsequenz des HA2 von X-31 und A/Japan

Qiao und Mitarbeiter konnten zeigen, daß der Austausch von Valin an Position 55 gegen Prolin und/oder der Austausch von Serin an Position 71 gegen Prolin die Fusion verhindert bzw. hemmt [Qiao et al., 1998]. Prolin destabilisiert coiled-coil-Strukturen. Die Autoren schlußfolgerten, daß der “spring loaded mechanism” zu einem relativ frühen Zeitpunkt der Fusion notwendig ist.

Wie in Abbildung 39 zu erkennen, liegt der gegebenenfalls für den “spring loaded mechanism” wichtigste Unterschied zwischen dem HA von Influenza X-31 und dem von Influenza A/Japan in den Positionen 61 und 65, die sich beide in der Loop-Region befinden, die im Laufe der

Konformationsumwandlung in eine Helix übergehen muß. Bei Influenza X-31 befinden sich Glutaminsäure an Position 61 und Glutamin an Position 65, also polare Aminosäuren mit großen Seitenketten. Bei Influenza A/Japan sind diese durch Threonin, also eine kleine unpolare Aminosäure, ersetzt.

Dieser Unterschied allein kann aber nicht die Verschiedenheit der beiden Stämme hinsichtlich ihres Fusions- und Inaktivierungsverhaltens erklären, zumal die HA2-Reste 61 und 65 in der finalen TBHA2-Struktur nicht im Bereich des Interfaces der Helizes liegen würden, also relativ unkritisch für die Bildung einer coiled-coil-Struktur wären.

Vielmehr scheint (wie in Abbildung 38 ersichtlich) die große Variabilität der HA1-Untereinheit (neben der Antigen-Funktion und der Bindung an den Rezeptor) auch für die Fusion von großer Bedeutung zu sein. In gegenwärtigen Fusionsmodellen spielt das HA1 kaum eine Rolle. Wie aber auch aus Abbildung 40 ersichtlich wird, umhüllt das dunkelblau dargestellte HA1 große Teile des Gesamtmoleküls bis hinunter in die Stammregion. Es ist durchaus denkbar, daß HA1 eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der metastabilen Konformation des neutralen HA und für einen gerichteten Ablauf der Konformationsumwandlung spielt.

Da die Darstellung des HA in Abbildung 36 die Oberflächenansicht der dreidimensionalen Struktur zeigt, die ja - wie erwähnt - besonders von dem (variablen) HA1 geprägt wird, sind die geringen Unterschiede zwischen den Stämmen bemerkenswert und könnten auch auf die funktionelle Bedeutung der dreidimensionalen Struktur des HA1 hinweisen. Ein wichtiger und augenfälliger Unterschied zwischen den beiden Strukturen ist etwa 100 Å vom distalen Ende des HA entfernt zu erkennen, also in jenem Bereich, wo in der Röntgenstruktur des HA von Influenza X-31 die Fusionssequenz lokalisiert werden konnte. Der Vergleich zwischen den beiden Strukturen ist für diese Region in Abbildung 41 noch einmal gesondert dargestellt.

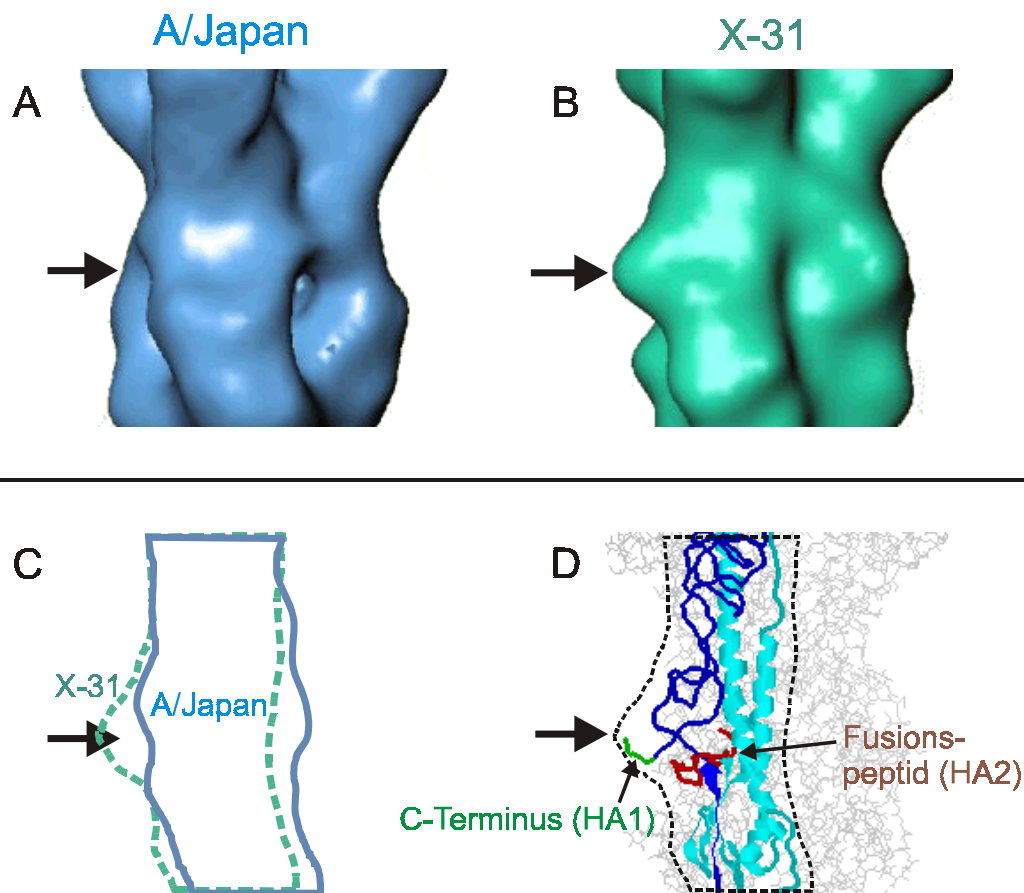


Abbildung 41 Vergleich eines Abschnittes der 3D-Struktur des HA von Influenza A/Japan (A) und X-31 (B). C zeigt jeweils die Kontur des vorderen Monomers (Influenza A/Japan blau, Influenza X-31 grün), in D ist die Röntgenstruktur des vorderen Monomers von X-31 dargestellt (nähere Erläuterungen im Text).

Abbildung 41 C zeigt jeweils die Kontur des vorderen Monomers (Influenza A/Japan blau, Influenza X-31 grün). In Abbildung 41 D ist der exponierte C-Terminus grün hervorgehoben (AA 325-328). Eine geringere Exponierung des (um eine Aminosäure kürzeren) C-Terminus von HA1, der bei X-31 mit Lys, Gln, Thr und mit einer großen polaren Aminosäure (Arg) und bei A/Japan mit Ile, Glu und dem kleinen unpolaren Serin endet, würde die Kontur des HA-Monomers von A/Japan an dieser Stelle (Pfeil in Abbildung 41!) verjüngen. Auch der

darüberliegende HA1-Loop, der zum N-Terminus von HA1 gehört (um AA 20) sollte weniger ausgeprägt sein, da HA1, wie die Sequenzalignierung zeigte, am N-Terminus deutlich kürzer ist (10 AA). Genau diese Veränderungen spiegeln sich in der 3D-Struktur des HA von A/Japan wider. Dies zeigt nochmals eindrucksvoll die Leistungsfähigkeit der angewendeten Methode und gibt eine Vorstellung von der erreichten Auflösung von 10 Å.

Das Fusionspeptid von Influenza X-31 ist in Abbildung 41 D rotbraun dargestellt. Obwohl wir nicht in der Lage sind, bei der gegenwärtig erreichten Auflösung von 10 Å das Fusionspeptid in der 3D-Struktur von Influenza A/Japan zu lokalisieren, ist es durchaus vorstellbar, daß bei einer Verjüngung des Monomers durch eine vom Influenza X-31 abweichende HA1-Struktur in diesem Bereich auch die Lage des -für die Fusion so wichtigen- Fusionspeptides beeinflußt sein kann. Bizebard und Mitarbeiter fanden, daß sich zwar die innere Struktur der Kopfgruppendomänen bei niedrigem pH nicht ändert, daß aber der N-Terminus von HA1 (AA 1-43) bei niedrigem pH sehr variabel ist [Bizebard et al., 1995].

6.1.1. Die Bedeutung der Glykosylierung des HA für die Struktur

Da es sich bei HA um ein Membranglykoprotein handelt, ist natürlich der Einfluß der Glykosylierung auf die Struktur mit zu berücksichtigen.

Die Glykosylierung von HA unterscheidet sich hinsichtlich Anzahl und Lokalisation der Oligosaccharide für die verschiedenen Subtypen ganz erheblich (teilweise sogar für Varianten innerhalb der Subtypen) [Nobusawa et al., 1991].

Die biologische Funktion der Glykosylierung ist zur Zeit noch ungenügend verstanden. Besondere funktionelle Bedeutung wird den Oligosacchariden an den Glykosylierungsstellen um Aminosäure-Position 21 der HA1-Kette (Asn 21 oder Asn 20 u. 21 oder Asn 22) und am Asn 154 der HA2-Kette beigemessen, da diese stark konserviert sind. Auch die Glykosylierungsstelle am Asn 38 im HA1 (X-31-Nummerierung) existiert bei den meisten analysierten Stämmen [Nobusawa et al., 1991; Ohuchi et al., 1997].

All diese konservierten bzw. semikonservierten Glykosylierungsstellen liegen in der Stammregion des HA und scheinen eine besondere Bedeutung für die Faltung und den Export

des HA vom Endoplasmatischen Retikulum zu haben. HA, dem die Oligosaccharide in allen drei Positionen fehlen, werden nicht in HA1 und HA2 gespalten und durchlaufen nicht die Modifikationen, die sich normalerweise im Golgi-Apparat und im TGN vollziehen.

Der Einfluß der Oligosaccharide auf die Fusion bzw. auf die Ausbildung einer fusionsaktiven Struktur bei saurem pH-Wert ist schwer zu erfassen. Wir haben versucht, durch enzymatische Deglykosylierung (N-Glycanase) am intakten Virus und anschließende spektrofluorimetrische Fusionsmessung den Einfluß der Glykosylierung auf die Fusion zu untersuchen. Der Vorteil der enzymatischen Deglykosylierung liegt gegenüber der biosynthetischen Modifizierung von Oligosacchariden in der Entfernung der Kohlenhydrate vom funktionell gespaltenen, gefalteten und oligomerisierten HA, d.h. eine durch das Fehlen der Oligosaccharide verursachte (und möglicherweise für die biologische Funktion relevante) Modifikation des Proteins während der Biosynthese wird vermieden. Der Nachteil liegt allerdings in der möglicherweise schlechten Zugänglichkeit der Oligosaccharidreste wegen der hohen HA-Dichte am intakten Virus, insbesondere für die Oligosaccharide in der Stammregion des HA.

Da die Enzymbehandlung eine sechsstündige Inkubation der Viren bei 37°C erforderte, wurden die Versuche (wegen dessen Stabilität gegen Inaktivierung) am Stamm Influenza A/Japan durchgeführt. Es konnten keine Unterschiede zwischen der enzymbehandelten Probe und einer entsprechenden Kontrolle gefunden werden. Allerdings konnte weder mit der PAS-Färbung von SDS-PAGE [Kapitany et al., 1973] noch mittels Zuckerbestimmung mit Phenol [Dubois et al., 1956] sicher eine tatsächlich erfolgte signifikante Reduzierung der Glykosylierung des HA nachgewiesen werden.

Für den hinsichtlich der Glykosylierung am besten untersuchten Influenzastamm A/FPV/Rostock/34 (H7-Subtyp) konnte in der Gruppe von H.-D. Klenk nachgewiesen werden, daß eine (biosynthetische) Entfernung der Oligosaccharide in der Kopfregion des HA-Trimers tatsächlich zu keiner Reduktion im Fusionsverhalten führte [Ohuchi et al., 1997]. Allerdings konnte in dieser Arbeit auch erstmals nachgewiesen werden, daß die Entfernung von Asn 12 (entspricht Asn 22 bei Influenza X-31) und Asn 28 (entspricht Asn 38 bei X-31) zu einer deutlichen Erhöhung des pH-Optimums der Fusion gegenüber dem Wildtyp-HA führt. Die Autoren schlußfolgerten, daß die Glykosylierung in der Stammregion notwendig ist, um den

metastabilen Zustand des HA bei neutralem pH aufrechterhalten zu können.

Um abzuschätzen, welche Rolle die Glykosylierung für die äußere Struktur des HA spielt (und damit auch eine Vorstellung vom möglichen Anteil der Kohlenhydrate an der Struktur von Influenza A/Japan zu bekommen), wurde in Abbildung 42 der 3D-Struktur von HA (Röntgenstruktur von X-31, low-pass-gefiltert zu 10 Å) dem vorderen Monomer ein Cartoon der Röntgenstruktur überlagert (HA1 blau, HA2 cyan). Die im HA von X-31 glykosylierten Asparagine sind jeweils durch Pfeile markiert. Die Liganden, die in der Röntgenkristallstruktur von BHA (benutzter PDB-Eintrag: 4hmg) enthalten sind und damit auch zur äußeren Struktur der uns zum Vergleich dienenden low-pass-gefilterten Struktur ("B" in Abbildung 36) beitragen, wurden farbig dargestellt: in gelb N-acetylglucosamin und in rot Mannose, die im nativen HA von X-31 ebenfalls vorkommenden Kohlenhydrate Fukose und Galaktose sind nicht enthalten, eine (in der Topregion) assoziierte Sialinsäure ist grün dargestellt.

Es ist ersichtlich, daß die Kohlenhydrate (die ja vorwiegend an der Oberfläche des Proteins angeordnet sind), die äußere Gestalt relativ wenig beeinflussen. Zwar sind nur ein Teil der Oligosaccharide als Liganden in der Röntgenstruktur vorhanden, allerdings ist der Kohlenhydrat-Anteil bezogen auf die Größe des HA im Vergleich zu anderen Glykoproteinen ohnehin recht gering (bei Influenza X-31 ca. 19 Gewichtsprozent). So ist auch nicht zu erwarten, daß die Morphologie des HA durch die Oligosaccharide dominiert wird. Laut Wiley et al. (1987) werden lediglich 17-20% der HA-Oberfläche durch Kohlenhydrate bedeckt. In der Darstellung von Abbildung 42 wird deutlich, daß die am Asn 165 des HA1 von X-31 gebundenen Oligosaccharidketten aber immerhin die Struktur der Kopfreion beeinflussen (A/Japan enthält an dieser Position keine potentielle Glykosylierungsstelle). Wiley und Skehel (1987) nahmen an, daß durch die Oligosaccharide in der Kopfreion die trimere Struktur des HA stabilisiert wird, diese Annahme wurde aber bisher nicht bestätigt.

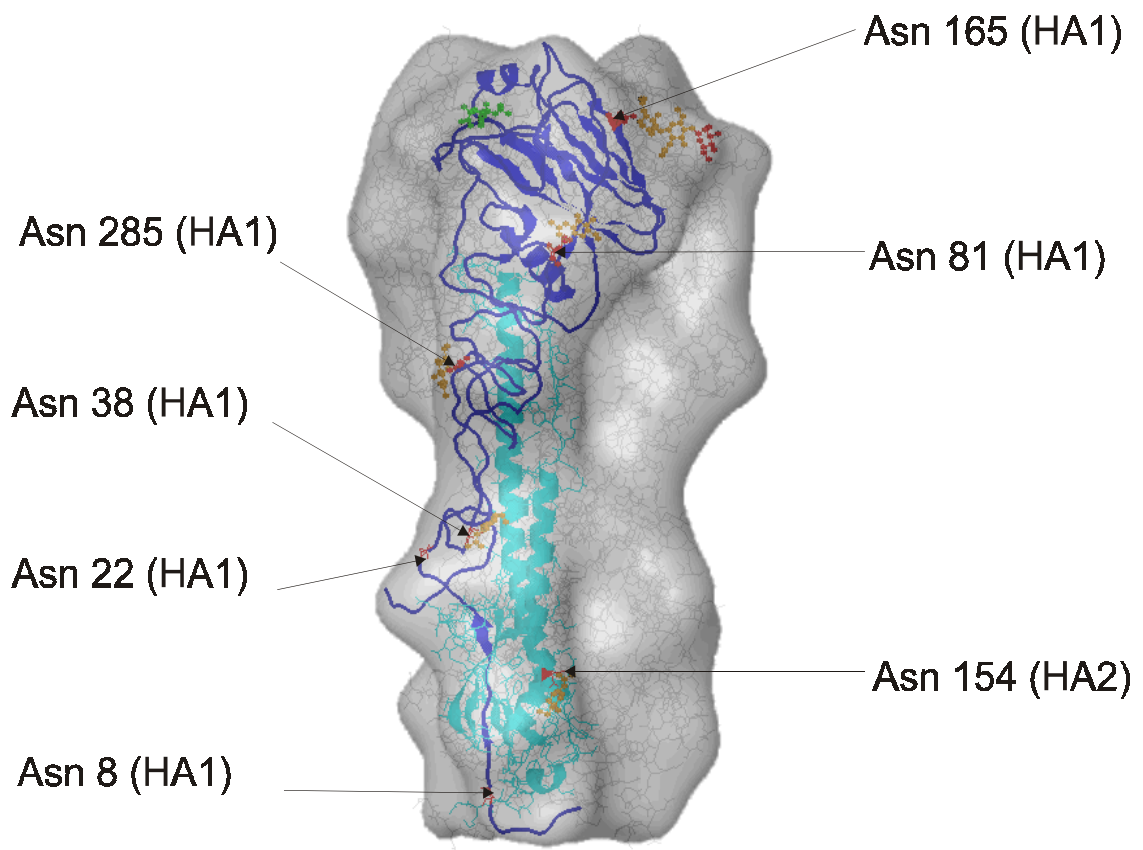


Abbildung 42

Einfluß der Glykosylierung auf die äußere Struktur des HA. In der 3D-Struktur von HA (Röntgenstruktur von X-31, low-pass-gefiltert zu 10 Å) wurde dem vorderen Monomer ein Cartoon der Röntgenstruktur überlagert (HA1 blau, HA2 cyan). Die im HA von X-31 glykosylierten Asparagine (rot) sind jeweils durch Pfeile markiert. Einige Oligosaccharide sind als Liganden in der Röntgenstruktur enthalten und tragen somit zur äußeren Struktur bei, diese wurden farbig dargestellt. Einzelheiten s. Text

Die 3D-Rekonstruktion aus kryo-elektronenmikroskopischen Bildern visualisiert wahrscheinlich

auch die Oligosaccharide. Aber auch wenn die Struktur des HA nicht überwiegend von den Oligosaccharidketten dominiert wird, wäre für die Zukunft eine 3D-Rekonstruktion einer enzymatisch deglykosylierten Struktur denkbar, zumal isoliertes HA einer enzymatischen Behandlung besser zugänglich sein sollte. Wenn sich der Befund von Ohuchi und Mitarbeitern (1997) auch für andere Influenza-Stämme bestätigt (die entsprechenden potentiellen Glykosylierungsstellen sind z.B. auch bei den Influenza A/Japan vorhanden), wäre eine Deglykosylierung in der Stammregion u.U. eine Möglichkeit, weitere strukturelle Intermediate auf dem Weg von der metastabilen neutralen Struktur zur fusionsaktiven Struktur einzufangen.

6.2. Vergleich der 3D-Strukturen des HA von Influenza A/Japan bei neutralem pH und bei saurem pH, 4°C

Wie die Abbildung 34 (siehe Ergebnisteil) deutlich macht, blieb auch für die Struktur bei pH 5,0 und 4°C die trimere Struktur des HA weitgehend erhalten. Dieses Ergebnis hatten wir insofern erwartet, als daß auch frühere TEM-Bilder dieses Stammes, präpariert unter sauren pH-Bedingungen, keine Dissoziation der Monomere zeigten (nach visueller Einschätzung) [Puri et al., 1990].

Trotzdem hat das HA von Influenza A/Japan unter diesen Bedingungen (Inkubation bei pH 5,0, 4°C für 10 min, also ein Zeitrahmen, in dem auf alle Fälle Fusion abläuft) eine andere Konformation eingenommen. Die Unterschiede zwischen der “neutralen”, fusionsinaktiven 3D-Struktur und der “sauren” 3D-Struktur sind groß, verglichen mit den Unterschieden zwischen der neutralen 3D-Struktur und der Röntgenstruktur des HA von Influenza X-31. Wir können aufgrund der Methode der Einzelpartikelanalyse sicher sagen, daß die meisten der anwesenden HA diese Struktur angenommen haben müssen (s. S. 110 f.) und sich innerhalb der erreichten Auflösungsgrenze auch nicht voneinander unterscheiden!

Da unter diesen Bedingungen keine Inaktivierung des HA von Influenza A/Japan auftritt, können wir davon ausgehen, zumindest ein strukturelles Intermediat auf dem Weg zur fusionsaktiven Konformation eingefangen zu haben.

Auffallend sind vor allem ein deutlicher “Knick” im Monomer zwischen Stielregion und Kopfregion (der ziemlich exakt auf der Höhe der “Trypsin-Spaltungsstelle” von X-31 (HA1 AA 27-28), die während der primären Konformationsänderung exponiert wird [Wharton et al. 1986]), die Torsion der Ektodomäne und die Bildung eines Kanals durch das gesamte Trimer. Die (bis jetzt) erreichte Auflösung von 14 Å macht natürlich auch bei dieser Struktur die Lokalisation der Fusionssequenz (noch) unmöglich. Allerdings wäre es denkbar, daß die irisblendenartige Verdrehung des HA1 das bei neutralem pH in einer hydrophoben Tasche geschützt liegende Fusionspeptid exponiert, was die frühe Bindung entsprechender Antikörper an das Fusionspeptid erklären würde [White and Wilson, 1987; Stegmann et al., 1990]. Auf alle Fälle ermöglicht die mediale Aufweitung des Moleküls den Lösungsmittelmolekülen ein

Eindringen in das Innere des Proteins. Abbildung 43 zeigt die Veränderungen im Bereich des distalen Endes der inneren Helix von HA2 vor dem Übergang zu dem Loop, der sich im Rahmen der prognostizierten Ausbildung eines coiled-coil zu einer Helix umformen müßte (entspricht bei X-31 AA > 77).

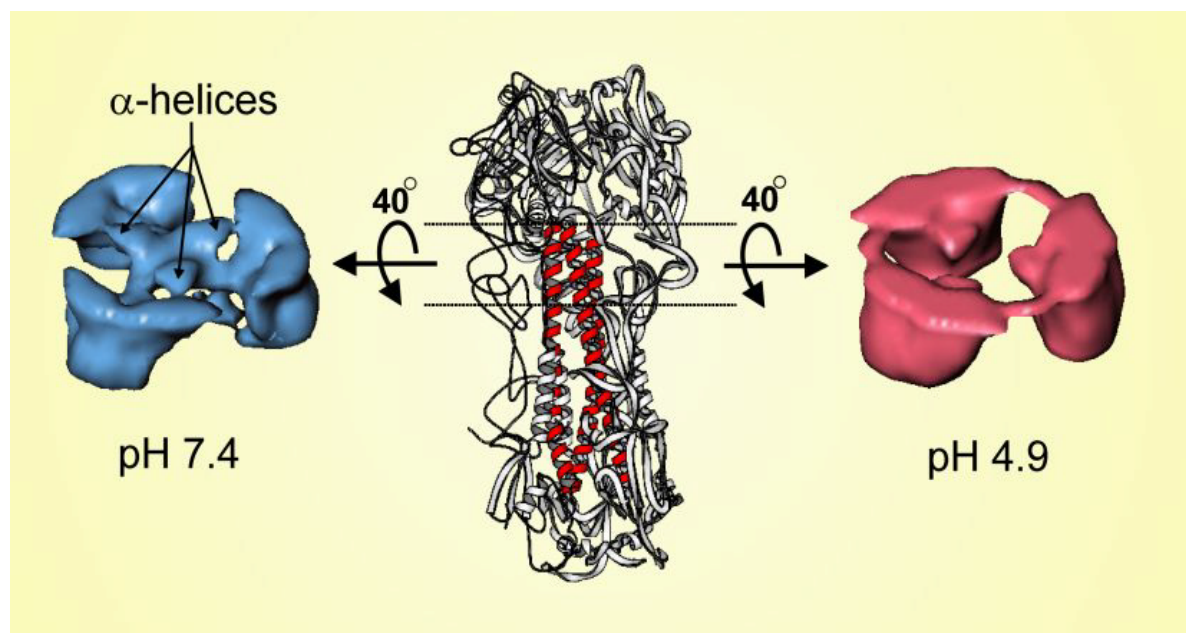


Abbildung 43 Vergleich der HA-Konformation von Influenza A/Japan bei neutralem pH-Wert und pH 5,0, 4°C. Die dargestellten Abschnitte entsprechen dem in der Röntgenstruktur von X-31 (verwendeter PDB-Eintrag: 2HMG) durch zwei Linien markierten Bereich und sind um 40° nach vorn geneigt.

Abbildung erstellt durch H. Stark.

Wie deutlich zu sehen ist, nimmt die Elektronendichte im Bereich der inneren Helix (bei neutralem pH noch gut den Helices zuzuordnen) deutlich ab. Dieses "Verschwinden" der Struktur läßt sich mit einer erhöhten Beweglichkeit in diesem Bereich erklären, wie er auch von Kim und Mitarbeitern gefunden wurde [Kim et al., 1996]. Noch deutlicher werden die Veränderungen in der Elektronendichte in Abbildung 44. Diese Abbildung zeigt transversale Schnitte durch die 3D-Struktur im Abstand von 2,16 Å (obere Reihe: neutraler pH, untere

Reihe: saurer pH, von links nach rechts: proximal). Offensichtlich ist dieser Bereich stark in die Konformationsänderung involviert.

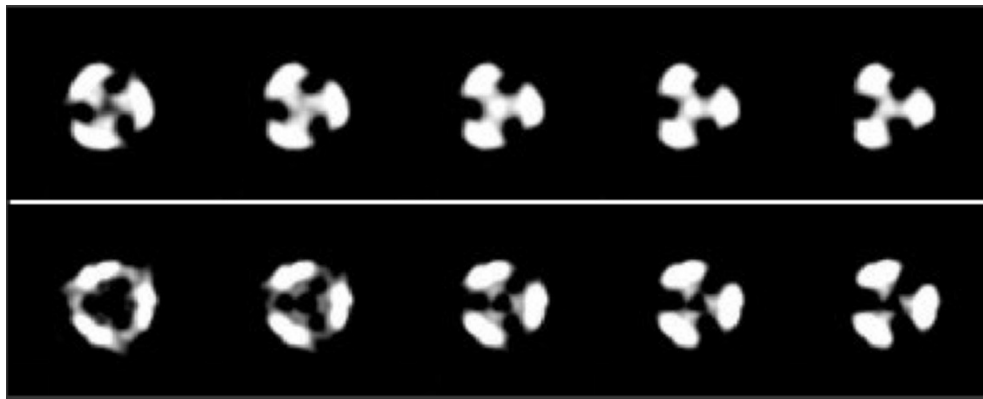


Abbildung 44 Schnitte (distal → proximal) durch die 3D-Struktur im Abstand von 2,16 Å (obere Reihe neutraler pH, untere Reihe saurer pH, 4°C)

Möglicherweise würde sich bei gebundener Targetmembran schon zu diesem Zeitpunkt die coiled-coil-Struktur ausbilden und das Fusionspeptid am distalen Ende des Proteins exponiert, ein Vorgang, der sich wegen des stark hydrophoben Charakters des Fusionspeptides in wässriger Umgebung wahrscheinlich nicht vollständig vollziehen wird (für die Relevanz dieser Annahme für weitere Strukturuntersuchungen siehe Ausblicke). Da sich das HA von Influenza A/Japan, sofern das Virus schon an die Zielmembran gebunden ist, durch saure und kalte (!) Vorinkubation in den sogenannten “commitment”-Zustand versetzen läßt (d. h. nach Reneutralisierung genügt lediglich eine Temperaturerhöhung, um Fusion auszulösen) und da ferner gezeigt werden konnte, daß die Verdauung von HA1 in diesem Zustand keinen Einfluß mehr auf das Fusionsausmaß hat [Schoch et al., 1992], erscheint diese Annahme begründet. Vorausgesetzt, daß auch HA1, welches Rezeptoren der Zielmembran gebunden hat, dem Verdau durch Thermolysin bzw. Proteinase K zugänglich war, wäre dies ein Hinweis darauf, daß das Fusionspeptid schon in die Targetmembran eingetaucht ist. Die von uns beobachtete Abflachung der distalen Topregion der HA-Monomere würde dies erleichtern.

Bisher wurde meist davon ausgegangen, daß die Monomere im Rahmen der Konformationsänderung bei saurem pH sehr schnell dissoziieren und damit auch den proteolytischen Abbau des

Proteins ermöglichen [Skehel et al., 1982; Doms et al., 1985]. Unsere fusionskompetente Struktur widerspricht dieser Ansicht. Weder ist diese Struktur dem proteolytischen Abbau durch Proteinase K voll zugänglich (siehe Ergebnisse), noch scheint durch die weiterhin enge Assoziation der Monomere ein Einsatz entsprechender medial bindender Antikörper sinnvoll (siehe White & Wilson (1987)).

Sollte sich schon zu einem frühen Zeitpunkt eine coiled-coil- Struktur im Inneren ausbilden ohne daß die HA-Monomere dissoziieren, wäre damit lediglich die Relokalisation des Fusionspeptides zur Zielmembran zu erklären, nicht aber eine für die Fusion erforderliche Annäherung der viralen Membran an die Zielmembran. Dabei bleibt die Frage offen, warum die einfache Relokalisation des Fusionspeptides mit dem Vorgang der Konformationsänderung verbunden ist, der wahrscheinlich die meiste freie Energie bereitstellt. Bleiben die HA-Monomere aber eng assoziiert, ist möglicherweise der Vorgang der Relokalisation des Fusionspeptides energieaufwendiger als bisher angenommen [Bentz, 2000b]. Der Helix-Turn-Übergang der Aminosäuren 106-112 in der Röntgenstruktur von TBHA2 [Bullough et al., 1994] könnte, sofern er auch wirklich am vollständigen HA stattfindet, dann für die Annäherung der Membranen verantwortlich sein, wie bereits von vielen Autoren vorgeschlagen [Bullough et al., 1994; Chen et al., 1995; Hernandez et al., 1996; Carr et al., 1997]. In welchem Ausmaß und in welcher zeitlichen Abfolge diese Schritte ablaufen und ob es sich dabei überhaupt um einen mehrstufigen Prozeß handelt, ist zum jetzigen Zeitpunkt schwer zu sagen. Allerdings konnte unter Verwendung von Antikörpern gezeigt werden, daß es in einer frühen (schnellen) Phase zu einer Exponierung des Fusionspeptides kommt, während erst in einer zweiten, langsameren Phase der Konformationsumwandlung die Topregion des Trimers dissoziiert [White and Wilson, 1987]. Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen unserer CD-spektroskopischen Untersuchungen [Korte et al., 1997]. Außerdem konnte für Influenza X-31 gezeigt werden, daß bei 0°C, pH 5,1 Fusion abläuft ("cold fusion"), ohne daß es zu sichtbaren (negative stain und Kryo-TEM) Veränderungen in der Kopfgruppenregion kommt [Stegmann et al., 1990]. Die Autoren schlossen auf einen sequentiellen Ablauf der Konformationsänderung, deren früheste (pH-abhängige) Phase schon für eine Fusion ausreichend ist.

Wegen der nicht beobachteten Konformationsänderung in der Kopfgruppenregion wurde in

derselben Arbeit deshalb ein revidiertes Fusionsmodell aufgestellt, bei dem davon ausgegangen wurde, daß die Fusionspeptide seitlich exponiert werden, da eine distale Exponierung ohne Aufweitung der Topdomänen unmöglich schien. Wir können nun erstmals zeigen, daß es, obwohl im elektronenmikroskopischen Bild rein visuell nicht wahrnehmbar, tatsächlich zu einer erheblichen Aufweitung im Bereich der Kopfgruppen kommt. Obgleich wir nicht ausschließen können, daß das Fusionspeptid, wie von einigen Autoren vermutet [Kozlov & Chernomordik, 1998; Bentz, 2000b] zuerst in die virale Membran eintaucht, gibt unsere 3D-Struktur dafür keinerlei Anhaltspunkte.

Eher scheint der sich ausbildende Kanal "richtungsweisend" für die Relokalisation des Fusionspeptides zur Zielmembran zu sein. In der Tat konnte schon 1992 gezeigt werden, daß die Fusionsaktivität des HA unterbunden ist, wenn die Monomere kovalent durch zusätzliche Disulfidbrücken in der Kopfgruppe miteinander verbunden werden [Godley et al., 1992].

6.3. Vergleich der 3D-Strukturen des HA von Influenza A/Japan bei saurem pH, 4°C und 37°C

Abbildung 45 zeigt die errechnete 3D-Struktur von HA des Stammes Influenza A/Japan nach zehnminütiger Inkubation bei pH 5,0, 37°C im Vergleich zu den beiden bisher betrachteten Strukturen.

Überraschenderweise ähnelt diese Struktur sehr der 3D-Struktur bei neutralem pH-Wert.

Carr und Mitarbeiter konnten zeigen, daß es sich bei der neutralen Struktur des HA nicht nur um eine metastabile Struktur handelt, eine Denaturierung des HA zeigt auch deutliche Parallelen zwischen denaturierter und TBHA2- Struktur [Carr et al., 1997].

Trotzdem führt pH-Erniedrigung allein nicht automatisch zu einer dem TBHA2 vergleichbaren Struktur, wie in zahlreichen Arbeiten gezeigt werden konnte und wie es bei einem "spring loaded mechanism" vielleicht zu erwarten wäre [White and Wilson, 1987; White, 1995; Wharton et al., 1995].

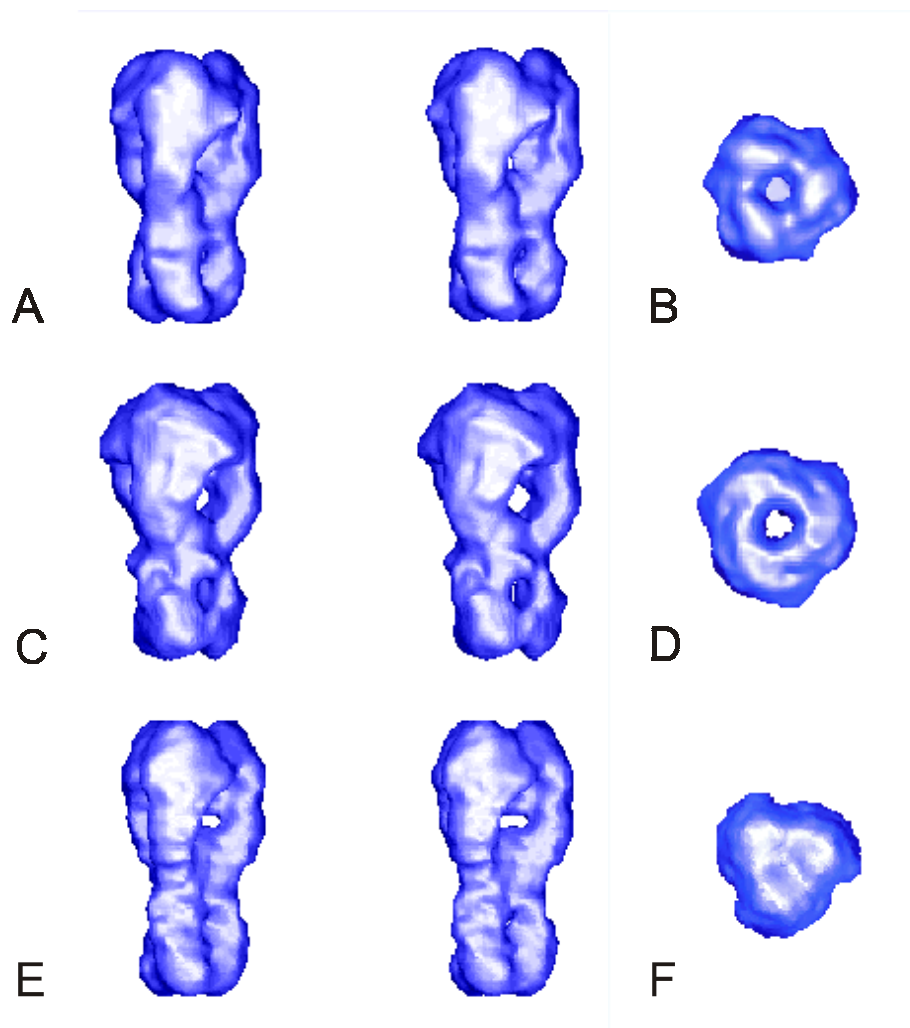


Abbildung 45

Vergleich der 3D-Strukturen des HA von Influenza

A/Japan/305/57 in der seitlichen Ansicht (A,C,E;Stereobilder) und in der Ansicht von oben (B,D,F) bei

A,B: neutralem pH-Wert; C,D: pH 5,0, 4°C; E,F: pH 5,0, 37°C für 10 min

Stegmann und Mitarbeiter konnten zeigen, daß der letzte Schritt der Fusion nicht mehr pH-abhängig ist [Stegmann et al., 1990]. Auch der “commitment-state” einiger Influenza-Stämme, z.B. Influenza A/Japan, erfordert für die finale Fusion keinen niedrigen pH-Wert. Wie im

Ergebnisteil beschrieben, ist die pH-Abhängigkeit nach “commitment” sogar in Richtung höherer pH-Werte verschoben. Die Frage, die sich stellt, ist, ob der “commitment-state” nur auf einen eingeschränkten Lipidfluß oder auf eine noch nicht vollständige Konformationsänderung des HA zurückzuführen ist. Unsere 3D-Struktur bei saurem pH und 4°C, die deutlich verschieden von der 3D-Struktur bei neutralem pH ist und stabil von nahezu allen HA unter diesen Bedingungen eingenommen wird, spricht dafür, daß der ersten Konformationsänderung noch weitere folgen, wobei die fusionsaktive Konformation (die vollständig eventuell auch nur in Anwesenheit der Targetmembran eingenommen wird, s. “Resümee und Ausblick”) unter Umständen ein Intermediat auf dem Wege zur inaktiven Konformation darstellt. Für letzteres sprechen unter anderem unsere CD-Messungen (siehe oben).

Bei Bindung an die Ziellmembran führt pH-Erniedrigung bei niedriger Temperatur also zu einem aktivierten Intermediat, pH-Erniedrigung *und* Zufuhr thermischer Energie führen zur Fusion. Ohne Bindung kommt es durch pH-Erniedrigung bei niedriger Temperatur ebenfalls zu einem aktivierten Intermediat (fusionskompetente Konformation), pH-Erniedrigung *und* Zufuhr thermischer Energie scheinen aber - laut unserer 3D-Struktur bei pH 5,0 und 37°C - die Konformationsumwandlung zu reversieren.

Auch wenn unsere CD-spektroskopischen Untersuchungen eine teilweise Reversibilität der Konformation ergaben (bei 37°C, nach 15 min reneutralisiert), konnten wir diese nur für die langsame zweite Phase der Konformationsänderung beobachten [Korte et al., 1997]. Auch die Zugänglichkeit für Proteinase K (siehe Ergebnisteil) widerspricht einer vollständigen Reversibilität der Konformationsänderung in Abwesenheit von Ziellmembranen.

Allerdings gelang es trotz aller Bemühungen nicht, eine Auflösung besser als 17 Å für die errechnete 3D-Struktur bei pH 5,0, 37°C zu erreichen. Das bedeutet, unsere 3D-Struktur der neutralen Konformation besitzt demgegenüber eine fast 5fach höhere Informationsdichte.

Ursache dafür ist vermutlich eine höhere Variabilität der Einzelmoleküle untereinander bei pH 5,0, 37°C:

Für die 3D-Struktur bei neutralem pH wurden ca. 2.900 HA-Trimere verwendet, für die 3D-Struktur bei pH 4,9, 4°C waren es etwa 1.800, das entsprach in beiden Fällen ungefähr 80% aller für die Bildverarbeitung digitalisierten Einzelbilder. Die verbleibenden 20%, die nicht in die

Rekonstruktion der 3D-Struktur eingingen, weil die HA-Trimere während der Probenpräparation beschädigt oder durch Staubpartikel kontaminiert wurden, sich einander überlappten, am Rand des Negativs lagen, Strahlenschäden erlitten hatten oder ungleichmäßig kontrastiert waren, wurden während der MSA- und Klassifizierungsprozeduren vom Datensatz ausgeschlossen (siehe Abschnitt "Grundlagen der Bildverarbeitung"). Innerhalb der erreichten Auflösungsgrenze der 3D-Struktur sind die Einzelpartikel zueinander nicht mehr variabel.

Für die Struktur bei pH 5, 37°C wurden jedoch ca. 3.000 HA-Trimere digitalisiert, in die vorgestellte 3D-Struktur gingen aber nur etwa 1.000 HA-Trimere ein, d. h. der Anteil der HA-Trimere, die im Bildverarbeitungsprozeß ausgeschlossen wurden, liegt weit höher und weist deutlich auf eine Variabilität der HA-Trimere hin.

Es kann also nur mit Sicherheit festgestellt werden, daß mindestens 30% der HA-Trimere unter diesen Bedingungen dieselbe 3D-Struktur aufwiesen, die innerhalb der erreichten Auflösungsgrenze von 17 Å zwischen den Einzelpartikeln nicht variierte.

Für die Untersuchung weiterer Konformationsintermediate - namentlich für die nachgeordnete langsamere Phase der Konformationsänderung, die eventuell fließend in den inaktivierten Zustand übergeht - muß geprüft werden, ob das HA von Influenza A/Japan auch geeignet ist. Während isolierte Virionen von Influenza A/Japan/305/57 auch bei längerer Inkubation unter Fusionsbedingungen keine durch einfache Elektronenmikroskopie auflösbaren morphologischen Veränderungen aufweisen [Puri et al., 1990], zeigen isolierte Virionen des Stammes Influenza A/PR/8/34 sehr schnell starke Veränderungen, die dem extended coiled-coil entsprechen könnten. White und Wilson (1987) konnten bei Influenza X-31 die schnelle (Halbwertszeit 45 s) und die langsame Phase (Halbwertszeit 4 min) der Konformationsumwandlung durch die Bindung von Antikörpern charakterisieren. Nachdem wir mit der 3D-Struktur von A/Japan eine erste Konformation eingefangen haben, von der wir sicher sein können, daß es sich keinesfalls um eine inaktivierte Konformation handelt, wäre nun auch die Untersuchung weiterer konformerer Zustände am HA von Influenza X-31 lohnenswert. Das Hauptproblem wird in der Präparation einer homologen Probe bestehen, da -wie bereits mehrfach ausgeführt- die Bildverarbeitung isomorphe Teilchen erfordert. Wie aber bereits eingangs erwähnt, können Intermediate auch durch die Variation physikochemischer Eigenschaften stabilisiert werden. Vor

kurzem präsentierten wir Kryo-elektronenmikroskopische Bilder von X-31 nach einstündiger Inkubation bei 37°C und pH 7,4, pH 5,4 bzw. pH 5,0. Während bei pH 5,0 die Morphologie der HA-Spikes weitgehend zerstört schien, zeigten die HA-Trimere bei pH 5,4 - also unter Bedingungen, unter denen Fusion aber keine Inaktivierung stattfindet - eine (von pH 7,4 verschiedene) intakte Morphologie [Korte et al., 1999].

6.4. Relevanz der Befunde für die bestehenden Fusionsmodelle

In den bestehenden (jüngeren) Modellen zur HA-vermittelten Membranfusion wird inzwischen übereinstimmend der Ausbildung eines extended coiled-coil in den HA2-Untereinheiten des HA-Trimers [Bullough et al., 1994; Skehel et al., 1998] eine entscheidende Bedeutung für den Fusionsmechanismus zugemessen. Dabei bleibt offen, wie die durch die Ausbildung dieser Struktur freiwerdende Energie für die Annäherung der beiden zu fusionierenden Membranen genutzt wird.

In einer jüngst erschienenen Arbeit [Chen et al., 1999] wurde die Struktur eines stabilen und gegenüber TBHA2 (s. Einleitung) längeren Fragmentes von HA2, dem EHA2 (E. coli expressed HA2 residues 23-185) mit einer Auflösung von 1,9 Å aufgeklärt. In Abbildung 46 ist das Stereobild einer der beiden leicht variierenden Formen des EHA2 dargestellt (PDB-Code für beide Formen: 1QU1). Die Monomere enthalten die Aminosäuren 31-185 (blau) bzw. 33-178 (gelb und grün). Wie aus der Struktur erkennbar wird, scheint die stabile Form des HA2 tatsächlich geeignet, sowohl das Fusionspeptid zur Zielmembran zu bewegen als auch das Molekül gewissermaßen in der Mitte zu beugen, so daß sowohl die C-terminale Transmembrandomäne (AA > 185) als auch das N-terminale Fusionspeptid nahe beieinander lokalisiert sind.

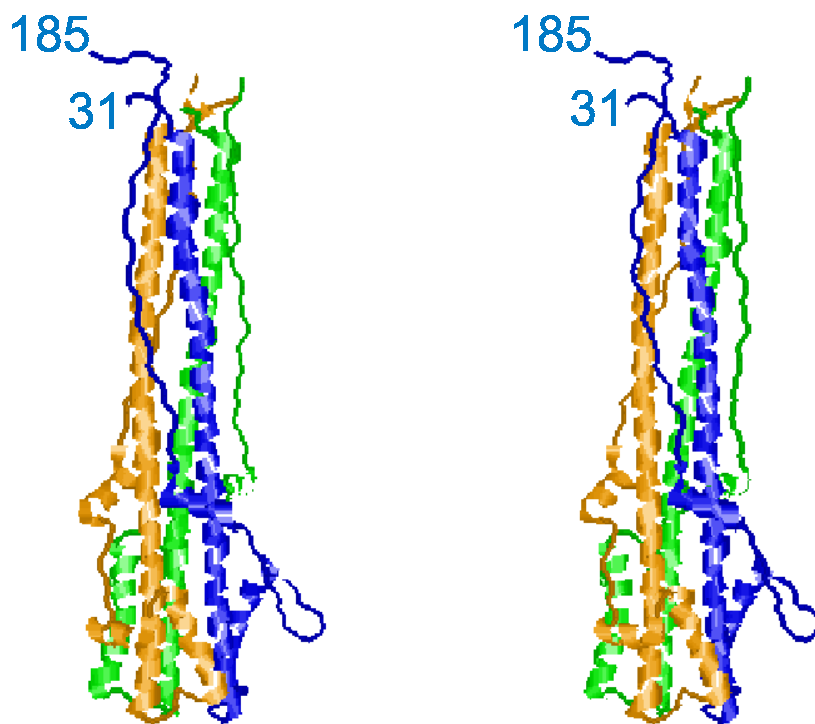


Abbildung 46 Stereobild von EHA2 nach Chen et al. (1999),
PDB-Code: 1QU1, Einzelheiten siehe Text.

Das längere EHA2 scheint darüber hinaus thermodynamisch stabiler zu sein als TBHA2 und könnte somit die Konformation minimaler freier Energie sein, in die alle strukturellen Veränderungen münden. Gleichzeitig zeigt dieser Fakt, daß auch nach der Bildung einer zentralen dreisträngigen coiled-coil-Struktur und dem Eintauchen des Fusionspeptides (vgl. TBHA2) durchaus noch zusätzliche freie Energie für die Membranfusion verfügbar sein könnte.

Ob die Fusion allerdings während der Kaskade struktureller Intermediate der Konformationsumwandlung oder erst mit ihrem Abschluß abläuft, bleibt ebenso offen, wie die Rolle des HA1, die bei den meisten Betrachtungen des Fusionsmechanismus bis jetzt unberücksichtigt blieb. Wie die Untersuchungen von Carr und Kim (1993) zeigten, bilden die drei jeweils von α -Helices eingeschlossenen Loop-Regionen des nativen HA2 eine stabile dreisträngige “coiled-coil”-Struktur, wenn sie als Proteinfragment in wäßriger Lösung vorliegen, und zwar auch bei neutralem pH!

Die eigentliche pH-Wert-Abhängigkeit der Konformationsumwandlung scheint also für das HA1 zu bestehen. Unter neutralen pH-Bedingungen wirkt das HA1 als stabilisierende “Kappe”. Die Umfaltung des HA1 ermöglicht erst die (spontane) Ausbildung der “coiled-coil”-Struktur. Die Frage nach dem “Wie” der Reorganisation des HA1 wird aber damit für das Verständnis des Fusionsprozesses immer wichtiger.

Hier liegt die Bedeutung unserer Befunde für die Aufklärung des Fusionsmechanismus: Wir konnten mit der Methode der dreidimensionalen Rekonstruktion aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen erstmals die strukturellen Veränderungen des *gesamten* HA dokumentieren. Dabei haben wir ein fusionskompetentes Intermediat eingefangen, daß noch eine deutliche Assoziation der drei Monomere zeigt. Es scheint auch sinnvoll, daß die coiled-coil-Struktur nicht ein “precursor” der Fusion ist, da diese Konformationsänderung sicher die meiste freie Energie für den Fusionsprozeß liefert. Ein schnelles Dissoziieren der HA1-Monomere könnte auch - analog zur EHA2-Struktur - zu einem Eintauchen der Fusionspeptide in die virale Membran führen, das HA wäre des Mechanismus’ für die notwendige Annäherung der zu fusionierenden Membranen beraubt.

Gleichzeitig zeigt sich aber eine definierte Aufweitung der Struktur, die für eine gerichtete Relokalisation der Fusionssequenz und deren Eintauchen in die Zielmembran verantwortlich sein könnte. Damit wird gewährleistet, daß die Fusionspeptide in die Zielmembran eintauchen, bevor es - nach weiterer Dissoziation der HA1-Monomere - zu einer Beugung in der Molekülmitte kommen kann.

7. Resümee und Ausblick

Es konnte gezeigt werden, daß die Kryo-Elektronenmikroskopie in Verbindung mit Bildverarbeitung eine geeignete Methode zur Erfassung der dreidimensionalen Struktur eines Proteins wie HA in verschiedenen konformeren Zuständen darstellt. Eine Limitierung der erreichbaren Auflösung ist theoretisch nur durch die instrumentelle Auflösungsgrenze des Elektronenmikroskops gegeben. Durch Verbesserungen sowohl in der Elektronenmikroskopie (z.B. durch den Einsatz von Feldemissionskathoden als Elektronenquelle) als auch in der Bildverarbeitung und Rechentechnik sind kontinuierliche Auflösungserhöhungen zu erwarten. Damit können zumindest supramolekulare Details wie z.B. helikale Domänen aufgelöst werden. Dies ist nicht nur dann wertvoll, wenn von dem Protein keine Kristalle für röntgenografische Untersuchungen zur Verfügung stehen, sondern könnte auch für die relative Anordnung von bereits strukturell aufgeklärten Fragmenten zueinander äußerst nützlich sein.

Voraussetzung für die weitere Erhöhung der Auflösung ist, wie bereits mehrfach im Rahmen dieser Arbeit ausgeführt wurde, die Homogenität der Probe. Eventuell vorhandene Unterschiede in der Konformation der Einzelpartikel führen im Ergebnis der auf Bildmittelung beruhenden Bildverarbeitungsverfahren zur Ausmittelung vorhandener Strukturdetails und damit zu einer Verringerung der Auflösung. Stabile Konformations-Intermediate innerhalb der Fusionskaskade lassen sich unter Umständen durch die geschickte Wahl von bestimmten Inkubationsbedingungen erhalten. So könnte das HA von Influenza X-31 nach Inkubation bei pH 5,4 und 37°C geeignet sein, ein fortgeschrittenes Intermediat auf dem Weg fusionskompetenterer Strukturen einzufangen. Unter diesen Bedingungen ist das Virus sehr schnell fusionsaktiv und wird gleichzeitig erst nach längerer Inkubation inaktiviert. Während aber bei Influenza A/Japan nach visueller Einschätzung entsprechender elektronenmikroskopischer Bilder keine Unterschiede in der Morphologie der HA-Trimere bei verschiedenen pH-Werten wahrnehmbar sind, ist die Morphologie der HA-Trimere von Influenza X-31 bei pH 5,0, 37°C weitgehend zerstört, bei pH 5,4 aber noch intakt (und von pH 7,4 verschieden!) [Korte et al., 1999]. Auch die enzymatische Deglykosylierung könnte zum Beispiel eine Möglichkeit darstellen, stabile Intermediate zu erzeugen (siehe Diskussion).

Für eine 3D-Rekonstruktion von Intermediaten, die in der Fusionskaskade weiter fortgeschritten sind, wird es aber sicher schwieriger, stabile homogene Populationen einheitlicher Konformation zu erzeugen. Es ist beispielsweise nicht zu erwarten, daß die hydrophobe Fusionssequenz des HA2 stabil in die wäßrige Umgebung exponiert wird. Ideal wäre die Aufklärung der 3D-Struktur des HA unter Fusionsbedingungen in Anwesenheit der Targetmembran. Dies leistet im Moment allerdings keine Methode. Es wäre aber durchaus denkbar, eventuell aus BHA “invertierte HA-Rosetten” zu bilden, die im Kopfbereich über Lipidmizellen assoziiert sind und damit über eine hydrophobe Umgebung an der Kopfregion verfügen.

Für die Zukunft ist natürlich auch Strukturaufklärung mittels Kryo-Elektronenmikroskopie und Bildverarbeitung an anderen viralen Fusionsproteinen denkbar. Dies ist vor allem deshalb sehr interessant, weil in Fusionsproteinen verschiedener Viren vergleichbare Strukturen gefunden wurden. So konnten bemerkenswert ähnliche coiled-coil- und Hairpin-Strukturen jeweils in löslichen Fragmenten der Fusionsproteine von Ebola und Moloney Murine Leukemia Virus, von SIV und HIV und von Influenza gefunden werden [Malashkevich et al., 1999]. Da wahrscheinlich auch den durch SNARE-Proteinen vermittelten zellulären Membranfusions-Prozessen coiled-coil-Strukturen zugrundeliegen [Sutton et al., 1998], könnte es sich dabei um einen konservierten Mechanismus der proteinvermittelten Membranfusion handeln. Das Verständnis dieses Mechanismus setzt aber die Kenntnis der Struktur der *kompletten* Fusionsproteine und deren Veränderungen im Fusionsgeschehen voraus. Dazu kann die Kryo-Elektronenmikroskopie in Verbindung mit Bildverarbeitung zukünftig einen wertvollen Beitrag leisten.

Literaturverzeichnis

Alford, D., Ellens, H., Bentz, J. (1994) Fusion of influenza virus with sialic acid-bearing target membranes.

Biochemistry **33**, 1977-1987

Almers, W. (1990) Exocytosis.

Annu. Rev. Physiol. **52**, 607-624

Bentz, J. and Ellens, H. (1988) Membrane fusion: Kinetics and mechanism.

Colloids Surf. **30**, 65-112

Bentz, J. (2000a) Minimal aggregate size and minimal fusion unit for the first fusion pore of influenza hemagglutinin mediated membrane fusion.

Biophys J. **78**, 227-245.

Bentz J. (2000b) Membrane Fusion Mediated by Coiled Coils: A Hypothesis.

Biophys J. **78**, 886-900.

Bizebard, T., Gigant, B., Rigolet, P., Rasmussen, B., Diat, O., Bösecke, P., Wharton, S.A., Skehel, J.J., and Knossow, M. (1995) Structure of influenza virus haemagglutinin complexed with a neutralizing antibody.

Nature, **376**, 92-94.

Blumenthal R., Bali-Puri A., Walter A., Covell D., Eidelman, O. (1987) pH-dependent fusion of vesicular stomatitis virus with Vero cells. Measurement by dequenching of octadecyl rhodamine fluorescence.

J Biol Chem **262**, 13614-13619 (Published erratum in J Biol Chem 1988, 263, 588)

Blumenthal, R., Schoch, C. Puri, A., Clague, M.J. (1991) A dissection of steps leading to viral envelope protein-mediated membrane fusion.

Annals of the New York Academy of Sciences, V. **635**, 285-296

Blumenthal, R., , Sarkar, D.P., Durell, S., Howard, D.E., Morris, S.J. (1996) Dilation of the influenza hemagglutinin fusion pore revealed by the kinetics of individual cell-cell fusion events.

J Cell Biol. **135**, 63-71.

Böttcher, C.J.F., van Gent, C.M., Pries, C. (1961) A rapid and sensitive sub-micro phosphorus determination.

Anal. Chim. Acta **24**, 203-204

Bullough, A., Hughson, M.H., Skehel, J.J., and Wiley, D.C. (1994) "Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion" Nature, **371**, 37-43.

Carr, C.M. and Kim, P.S. (1993) A spring loaded mechanism for the conformational change of influenza hemagglutinin.

Cell, **73**, 823-832.

Carr, C.M., Chaudhry, C., Kim, P.S. (1997) Influenza hemagglutinin is spring-loaded by a metastable native conformation.

Proc Natl Acad Sci U S A, **94**, 14306-14313

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (1997) Isolation of Avian Influenza A(H5N1) Viruses from Humans—Hong Kong, May-December 1997.

Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR), Vol. **46**/ No. 50, 1204-1207

Chen, J., Wharton, S.A., Weissenhorn, W., Calder, L.J., Hughson, F.M., Skehel, J.J., Wiley, D.C. (1995) A soluble domain of the membrane-anchoring chain of influenza virus hemagglutinin (HA2) folds in *Escherichia coli* into the low-pH-induced conformation. Proc Natl Acad Sci U S A, **92**, 12205-12209

Chen, J., Skehel, J.J., Wiley, D.C. (1999) N- and C-terminal residues combine in the fusion-pH influenza hemagglutinin HA(2) subunit to form an N cap that terminates the triple-stranded coiled coil. Proc Natl Acad Sci U S A, **96**, 8967-72

Chernomordik, L., Chanturiya, A., Green, J., Zimmerberg, J. (1995a) The hemifusion intermediate and its conversion to complete fusion: regulation by membrane composition. Biophysical Journal, **69**, 922-929

Chernomordik, L., Kozlov, M., Zimmerberg, J. (1995b) Lipids in biological membrane fusion. Journal of Membrane Biology, **146**, 1-14

Chernomordik, L., Leikina, E., Kozlov, M.M., Frolov, V.A., Zimmerberg, J. (1999) Structural intermediates in influenza haemagglutinin-mediated fusion. Molecular Membrane Biology, **16**, 33-42

Compans, R.W., Bishop, D.H., Meier-Ewert, H. (1977) Structural components of influenza C virions. J. Virol. **21**, 658-665

Clague, M.J., Schoch, C., Blumenthal, R. (1993) Delay time of influenza virus hemagglutinin-induced membrane fusion depends on hemagglutinin surface density.

J. Virol. **65**, 2402-2407

Clague, M.J., Schoch, C., Blumenthal, R. (1991) Delay time for influenza virus hemagglutinin-induced membrane fusion depends on hemagglutinin surface density.

J Virol **65**, 2402-2407

Danieli, T., Pelletier, S.L., Henis, Y.I., White, J.M. (1996) Membrane fusion mediated by the influenza virus hemagglutinin requires the concerted action of at least three hemagglutinin trimers.

J Cell Biol, **133**, 559-569

Doms, R.W. Helenius, A. and White, J. (1985) Membrane fusion activity of the influenza hemagglutinin: The low pH-induced conformational change.

J. Biol. Chem. **260**: 2973-2981

Doms, R.W. and Helenius, A. (1986) Quarternary structure of influenza virus hemagglutinin after acidic treatment.

J. Virol. **60**, 833-838

Doms, R.W. (1993) Protein conformational changes in virus-cell fusion.

Methods Enzymol, **221**, 61-72

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K.; Rebes, P.A., Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances.

Analyt. Chem. **28**, 350-356

Durrer, P., Galli, C., Hoenke, S., Corti, C., Glück, R. Vorherr, T., and Brunner, J. (1996) H⁺-induced membrane insertion of influenza virus hemagglutinin involves the HA2 amino-terminal

fusion peptide but not the coiled coil region.

J. Biol. Chem. **271**, 13417-13421.

Ellens, H., Bentz, J., Mason, D., Zhang, F., White, J. (1990) Fusion of influenza hemagglutinin-expressing fibroblasts with glycophorin-bearing liposomes: role of hemagglutinin surface density.

Biochemistry **29**, 9697-9707

Frank, J. (1980) The role of correlation techniques in computer image processing, in: Hawkes P.W. (Hrsg.) Computer processing of electron microscope images, Springer, Berlin, 187-221

Gallaher, W.R. (1987) Detection of a fusion peptide sequence in the transmembrane protein of human immunodeficiency virus.

Cell., **50**, 327-328.

Gething, M.J., White, J.M., Waterfield, M.D. (1978) Purification of the fusion protein of Sendai virus: analysis of the NH₂-terminal sequence generated during precursor activation.

Proc Natl Acad Sci U S A. **75**, 2737-2740.

Gething, M.J., Bye, J., Skehel, J., Waterfield, M. (1980) Cloning and DNA sequence of double-stranded copies of haemagglutinin genes from H2 and H3 strains elucidates antigenic shift and drift in human influenza virus.

Nature **287**, 301-306

Godley, L., Pfeifer, J., Steinhauer, D., Ely, B., Shaw, G., Kaufmann, R., Suchanek, E., Pabo, C., Skehel, J.J., Wiley, D.C., (1992) Introduction of intersubunit disulfide bonds in the membrane-distal region of the influenza hemagglutinin abolishes membrane fusion activity.

Cell, **68**, 635-645.

Günther-Ausborn, S. and Stegmann, T. (1997) How lysophosphatidylcholine inhibits cell-cell fusion mediated by the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus.

Virology, **235**, 201-208

Günther-Ausborn, S., Praetor, A., Stegmann, T. (1995) Inhibition of influenza-induced membrane fusion by lysophosphatidylcholine.

Journal of Biological Chemistry, **270**, 29279-29285

Haraux, G., van Heel, M. (1986) Exact filters for general geometry three dimensional reconstruction.

Optik, **73**, 146-156

Harter, C., James, P., Bächli, T., Semenza, G., and Brunner, J. (1989) Hydrophobic binding of the ectodomain of influenza hemagglutinin to membranes occurs through the 'fusion peptide'.

J.Biol. Chem., **264**, 6459-6464.

Hernandez, L.D., Hoffman, L.R., Wolfsberg, T.G., White, J.M. (1996) Virus-cell and cell-cell fusion.

Annu Rev Cell Dev Biol, **12**, 627-61

Herrler, G., Klenk, H.D.(1991) Structure and function of the HEF glycoprotein of influenza C virus.

Adv Virus Res. 40:213-234

Herrmann, A., Clague, M.J., Blumenthal, R. (1993) Role of target membrane structure in fusion with influenza virus: effect of modulating erythrocyte transbilayer phospholipid distribution.

Membrane Biochem **10**, 3-15

Hoekstra, D., de Boer, T., Klappe, K., Wilschut, J.(1984) Fluorescence method for measuring the kinetics of fusion between biological membranes.

Biochemistry, **23**, 5675-5681

Huang, R.T., Rott, R., Wahn, K., Klenk, H.D., Kohama, T. (1980) The function of the neuraminidase in membrane fusion induced by myxoviruses.

Virology. **107**(2):313-9

Hughson F. M., (1995) Structural characterization of viral fusion proteins.

Curr Biol. **5**(3):265-74. Review.

Kapitany, R.A., Zebrowski, E.J.(1973) A high resolution PAS stain for polyacrylamide gel electrophoresis.

Anal. Biochem. **56**, 361-369

Kemble, G. W., Danieli, T., White, J.M. (1994) Lipid-anchored influenza hemagglutinin promotes hemifusion, not complete fusion.

Cell **76**, 383-391

Kim, C.H., Macosko, J.C., Yu, Y.G., Shin, Y.K., (1996) On the dynamics and confirmation of the HA2 domain of the influenza virus hemagglutinin.

Biochemistry **35**, 5359-65

Klenk, H.-D., Schlotissek, C., Rott, R. (1972) Inhibition of glycoprotein prosynthesis of influenza virus by D-glucosamine and 2-deoxy-D-glucose.

Virology, **49**, 723-734.

Korte, T., Ludwig, K., Herrmann, A. (1992) ph-dependent hydrophobicity profile of

hemagglutinin of influenza virus and its possible relevance in virus fusion.

Biosci Rep. **12**, 397-406.

Korte, T. and Herrmann, A. (1994) "pH-dependent binding of the fluorophore bis-ANS reflects the conformational change of hemagglutinin

Europ. Biophys. J., **23**, 105-113.

Korte, T. (1995) Kinetics of the low-pH conformational change of the hemagglutinin of influenza virus and its relevance for the process of virus-membrane fusion

Dissertation, Fachbereich Biologie, HU Berlin

Korte, T., Ludwig, K., Krumbiegel, M., Zirwer, D., Damaschun, G., Herrmann, A. (1997)

Transient changes of the conformation of hemagglutinin of influenza virus at low pH detected by time-resolved CD-spectroscopy.

J. Biol. Chem. **272**, 9764-9770

Korte, T., Ludwig, K., Booy, F.P., Blumenthal, R., Herrmann, A. (1999) Conformational Intermediates and Fusion Activity of Influenza Hemagglutinin.

J. Virol. **73**, 4567-4574

Kozlov, M.M., Chernomordik, L.V. (1998) A mechanism of protein-mediated fusion: coupling between refolding of the influenza hemagglutinin and lipid rearrangements.

Biophys. J. **75**, 1384-1396

Lebart, L., Morineau, A., Warwick, K.M. (1984) Multivariate descriptive statistical analysis.

Wiley, New York

Lima, M.C.P., Ramalho-Santos, J., Flasher, D., Slepishkin, S., Nir, S., Düzgünes, N. (1995)

Target cell membrane sialic acid modulates both binding and fusion activity of influenza virus.
Biochim. Biophys. Acta **1236**, 323-330

Loyter A., Citovsky, V., Blumenthal, R. (1988) The use of fluorescence dequenching measurements to follow viral membrane fusion events.
Methods Biochem. Anal. **33**, 129-64

Ludwig, K. Korte, T. Herrmann, A. (1995) Analysis of delay times of hemagglutinin-mediated fusion between influenza virus and cell membranes
Eur. Biophys. J. **24**, 55-64

Lüneberg, J., Martin, I., Nüßler, F., Ruyschaert, J.-M., Herrmann, A. (1995). Structure and topology of the influenza virus fusion peptide in lipid bilayers.
J. Biol. Chem. **270**, 27606-27614.

Malashkevich, V.N., Schneider, B.J., McNally, M.L., Milhollen, M.A., Pang, J.X., Kim, P.S.. (1999) Core structure of the envelope glycoprotein GP2 from Ebola virus at 1.9-Å resolution.
Proc Natl Acad Sci U S A. **96**, 2662-2667

Melikyan, G.B., White, J.M., Cohen, F.S. (1995) GPI-anchored influenza hemagglutinin induces hemifusion to both red blood cell and planar lipid membranes.
Journal of Cell Biology, **131**, 679-691

Nobusawa, E., Aoyama, T., Kato, H., Suzuki, Y., Tatenno, Y., Nakajima, K. (1991)
Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinins of influenza A viruses.
Virology **182**, 475-485

Nüßler, F., Schroth, B., Pomorski, T., Herrmann, A., Clague, M.J. (1995) Differential mixing of inner and outer membrane leaflets of erythrocyte ghosts in response to fusion with cells expressing GPI-anchored influenza hemagglutinin.

Mol Biol Cell, **6**, 182a

Nüßler, F., Clague, M.J., Herrmann, A. (1997) Metastability of the hemifusion intermediate induced by glycoposphatidylinositol-anchored influenza hemagglutinin.

Biophysical Journal, **73**, 2280-2291

Ohuchi, R., Ohuchi, M., Garten, W. Klenk, H.-D.(1997) Oligosaccharides in the stem region maintain the influenza virus hemagglutinin in the metastable form required for fusion activity.

Journal of Virology, **71**, 3719-3725

Palese, P., Tobita, K., Ueda, M., Compans, R.W. (1974) Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase.

Virology, **61**, 397-410.

Pak, C.C., Krumbiegel, M., Blumenthal, R. (1994) Intermediates in influenza virus PR/8 haemagglutinin-induced membrane fusion.

Journal of General Virology **75**, 377-383

Parvin, J.D., Mascona, A., Pan, W. T., Leider, J. M., Palese, P. (1986) Measurement of the mutation rates of animal viruses: influenza A virus and poliovirus type 1.

J Viorol **59**, 377-383

Pinto, L. H., Holsinger, L. J., Lamb, R.A. (1992). Influenza virus M₂ has ion channel activity.

Cell **69**, 517-528

Puri, A., Booy, F.P., Doms, R.W., White, J.M., Blumenthal, R.(1990). Conformational changes and fusion activity of influenza virus hemagglutinin of the H2 and H3 subtypes: effects of acid pretreatment.

J. Virol. **64**, 10108-10113

Qiao, H., Pelletier, S.L., Hoffman, L., Hacker, J., Armstrong, R.T., White, J.M. (1998) Specific single or double proline Substitutions in the “spring-loaded” coiled-coil region of the influenza hemagglutinin impair or abolish membrane fusion activity.

Journal of Cell Biology, **141**, 1335-1347

Ramvalho-Santos, J., Lima, M.C., Nir, S. (1996) Partial fusion activity of influenza virus toward liposomes and erythrocyte ghosts is distinct from viral inactivation.

J Biol Chem., **271**, 23902-23906

Rosen, C.G., Weber, G. (1969) Dimer formation from 1-Anilino-8-naphtalensulfonate catalyced by Bovine serum albumin. A new fluorescent molecule with exceptional binding properties.

Biochemistry, **10**, 113-122

Rosenthal, P.B., Zhang, X., Formanowski, F., Fitz, W., Wong, C.H., Meier-Ewert, H., Skehel, J.J., Wiley, D.C. (1998) Structure of the haemagglutinin-esterase-fusion glycoprotein of influenza C virus.

Nature, **396**, 92-6

Ruigrok, R.W.H., Aitken, A., Calder, L.J., Martin, S.R., Skehel, J.J., Wharton, S.A., Weis, W. (1988) Studies on the structur of the influenza virus haemagglutinin at the pH of membrane fusion.

J. Gen. Virol. **69**, 2785

Schatz, M., van Heel, M. (1990) Invariant classification of molecular views in electron micrographs.
 Ultramicroscopy, **32**, 255-64.

Schoch, C., Blumenthal, R., Clague, M. J. (1992). A long lived state for influenza-erythrocyte complexes committed to fusion at neutral pH. FEBS Letters **311**, 221-225

Scholtissek, C. (1996). Molecular Evolution of Influenza Viruses.
 Virus Genes **11:2/3**, 209-215

Shangguan, T., Siegel, DP., Lear, J.D., Axelsen, P.H., Alford, D., Bentz, J. (1998)
 Morphological changes and fusogenic activity of influenza virus hemagglutinin.
 Biophysical Journal. **74**, 54-62

Skehel, J.J. (1972) Polypeptide synthesis in influenza virus infected cells.
 Virology, **49**, 23-36.

Skehel, J.J., Bayley, P.M., Brown, E.B., Martin, S.R., Waterfield, M.D., White, J.M., Wilson, I.A., and Wiley, D.C. (1982) Changes in the conformation of influenza virus hemagglutinin at the optimum of virus-mediated fusion.
 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **79**, 968-972.

Skehel, J.J., Bizebard, T., Bulloughh, P.A., Hughson, F.M., Knossow, M., Steinhauer, D.A., Wharton, S.A. and Wiley, D.C. (1995) Membrane Fusion by Influenza Hemagglutinin.
 Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Volume **LX**, 573-580

Skehel, J.J. and Wiley, D.C. (1998) Coiled coils in both intracellular vesicle and viral membrane fusion.

Cell **95**, 871-874

Slavik, J. (1982) Anilinonaphthalene sulfonate as a probe of membrane composition and function.

Biochim Biophys Acta, **694**, 1-25

Spruce, A.E., Iwata, A., Almers, W. (1991) The first milliseconds of the pore formed by a fusogenic viral envelope protein during membrane fusion.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 3623-3627

Spruce, A.E., Iwata, A., White, J.M., Almers, W. (1989) Patch-clamp studies of single cell-fusion events mediated by a viral fusion protein.

Nature **342**, 555-558

Stark, H. (1996) Kryo-Elektronenmikroskopische Strukturuntersuchungen an 70S Ribosomen in funktionellen Zuständen der Proteinbiosynthese.

Dissertation, Fachbereich Chemie, FU Berlin

Stegmann, T., Bartoldus, I., Zumbrunn, J. (1995) Influenza hemagglutinin-mediated membrane fusion: influence of receptor binding on the lag phase preceding fusion.

Biochemistry **34**, 1825-1832

Stegmann, T., Booy, F.P., and Wilschut, J. (1987a). Effects of low pH on influenza virus: activation and inactivation of the membrane fusion capacity of the hemagglutinin.

J. Biol. Chem., **262**, 17744-17749.

Stegmann, T., Delfino, J.M., Richards, F.M., and Helenius, A. (1991). The HA2 subunit of influenza hemagglutinin inserts into the target membrane prior to fusion.

J.Biol. Chem., **266**, 18404-18410.

Stegmann, T., White, J.M., Helenius, A. (1990) Intermediates in influenza induced membrane fusion.

EMBO J. **9**, 4231

Steinkilberg, M., Schramm, H.J. (1980) Eine verbesserte Drehkorrelationsmethode für die Strukturbestimmung biologischer Makromoleküle durch Mittelung elektronen-mikroskopischer Bilder.

Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. **361**, 1363-1369

Stuart, D. (1994). Docking mission accomplished.

Nature **371**, 19-20

Sutton, R.B., Fasshauer, D., Jahn, R., Brunger, A.T. (1998) Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution.

Nature, **395**, 347-53.

Tashiro, M., Rott, R. (1996) The role of proteolytic cleavage of viral glycoproteins in the pathogenesis of influenza virus infections

seminars in Virology Vol. **7**, 237-243

Tse, F.W., Iwata, A. Almers, W. (1993) Membran flux through the pore formed by a fusogenic viral envelope protein during cell fusion.

J. Cell. Biol. **121**, 543-552

Van Heel, M., Frank, J. (1981) Use of multivariate statistics in analysing the images of biological macromolecules.

Ultramicroscopy **6**, 187-194

van Heel, M. (1984) Multivariate statistical classification of noisy images (randomly oriented biological macromolecules).

Ultramicroscopy, **13**, 165-183.

van Heel, M., Stöffler-Meilicke, M. (1985) Characteristic views of *E. coli* and *B. stearothermophilus* 30S ribosomal subunits in the electron microscope.

EMBO J., **4**, 2389-2395

van Heel, M. (1987) Angular reconstitution: a posteriori assignment of projection directions for 3D-reconstruction.

Ultramicroscopy, **21**, 111-124.

van Heel, M. (1989) Classification of very large electron microscopical image data sets.

Optik, **82**, 114-126

Varghese, J.N., Laver, W.G., Colman, P.M. (1983). Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution.

Nature **303**, 35-40

Wang, C., Takeuchi, K., Pinto, L. H., Lamb, R. (1993) Ion channel activity of influenza A virus M2 protein: characterization of the amantadine block.

J Virol **67**, 5585-5594

Wang, C., Lamb, R. A., Pinto, L. H. (1994). Direct measurement of the influenza A virus M₂ protein ion channel activity in mammalian cells.

Virology **205**, 133-140

Weber, T., Paesold, G., Mischler, R., Semenza, G., Brunner, J. (1994) Evidence for

H⁺-induced insertion of the influenza hemagglutinin HA2 N-terminal segment into the viral membrane.

J. Biol. Chem., **269**, 18353-18358.

Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S.C., Skehel, J.J., Wiley, D.C. (1998) Crystal structure of the Ebola virus membrane fusion subunit, GP2, from the envelope glycoprotein ectodomain. Mol. Cell **2**, 605-616

Wharton, S.A., Calder, L.J., Ruigrok, R.W.H., Skehel, J.J., Wiley, D.C. (1995) Electron microscopy of antibody complexes of influenza virus haemagglutinin in the fusion pH conformation
EMBO J., **14**, 240-246.

White, J.M. (1992) Membrane fusion.
Science, **258**, 917-924.

White, J.M. (1995) Membrane fusion: the influenza paradigm.
Cold Spring Harb Symp Quant Biol. **60**, 581-587.

White, J.M. and Wilson, I.A. (1987) Anti-peptide antibodies detect steps in a protein conformational change: low-pH activation of the influenza virus haemagglutinin.
J. Cell Biol., **105**, 2887-2896.

Wiley, D.C. and Skehel, J.J. (1987) The structure and function of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus.
Annu. Rev. Biochem., **56**, 365-394.

Wilson, I.A., Skehel, J.J., and Wiley, D.C. (1981) Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution.

Nature, **289**, 366-373.

Zimmerberg, J., Blumenthal, R., Sarkar, D.P., Curran, M., Morris, S.J. (1994) Restricted movement of lipid and aqueous dyes through pores formed by influenza hemagglutinin during cell fusion.

J. Cell Biol. **127**, 1885-1894

Danksagung

Eines vorweg: Ich habe mich in der Arbeitsgruppe “Molekulare Biophysik” immer sehr wohlgefühlt. Jetzt, da ich sie verlassen muß, spüre ich - vielleicht etwas sentimentale - Trauer (“...gewohnt nur dasjenige schmerzlich zu empfinden, was wir persönlich für die Folge zu entbehren haben.” [Goethe, 1829]), aber auch eine große Dankbarkeit, “dabei gewesen” sein zu dürfen für einen Zeitraum, welchen man unter bestehenden Verhältnissen schon als ‘sehr lang’ bezeichnen muß.

So ist es mir ein ganz aufrichtiges Bedürfnis, Prof. Andreas Herrmann zu sagen, daß ich viel von ihm gelernt habe: sowohl von dem sehr guten wissenschaftlichen Betreuer, der er stets war, vor allem aber von dem Menschen, dessen Interesse am Geschick seiner “Anbefohlenen” weit die heute gewohnte “sachliche Anteilnahme” übersteigt und damit das außergewöhnlich angenehme Klima in der Arbeitsgruppe erst begründet. Dafür und für die zahlreichen Gespräche in freundlicher Atmosphäre möchte ich ihm ganz herzlich danken!

Dr. Christoph Böttcher danke ich für eine Zusammenarbeit, die weit über das im Rahmen eines Sonderforschungsbereiches übliche hinausging, für seinen Optimismus bei unseren ersten Abenteuern im Dschungel der digitalen Bildverarbeitung und für so manche Tasse guten Tees. Seine virtuose Beherrschung des Elektronenmikroskops machte die Arbeit überhaupt erst möglich. In diesem Zusammenhang danke ich auch Christa Zecha, mit der ich manche (nur im engen Wortsinne “dunkle”) Stunde vor dem Elektronenmikroskop verbrachte.

Ein ganz herzlicher Dank an Dr. Holger Stark: Trotz permanenten Zeitdruckes nahm er sich des HA an und seiner Erfahrung in der Bildverarbeitung verdankt ein großer Teil dieser Arbeit überhaupt erst seine Existenz. Ihm noch einmal ein ganz großes Dankeschön dafür und auch nochmals an alle Vorgenannten, die zusammen mit Marin van Heel eine Leidensgeschichte rund um eine Publikation zu einem doch noch erfreulichen Ende gebracht haben.

Dr. Robert Blumenthal und Dr. Anu Puri möchte ich für die Möglichkeit der Fusionsmessung mit den GP4f-Zellen und für den gewinnbringenden Aufenthalt im “Building 10” danken.

Mein besonderer Dank gilt allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe “Molekulare Biophysik” für die angenehme Zusammenarbeit: Frau Hillebrecht, nicht nur für die Präparation von Virusmaterial und Hilfe und Unterstützung in vielen (Labor-)Lebenslagen, Dr. Thomas Korte, nicht nur deshalb, weil uns ein paar Themen ganz besonders verbunden haben, Dr. Thomas Pomorski nicht nur für Rat und Tat seit der Wohnheimzeit, Dr. Peter Müller nicht nur dafür, immer ein offenes Ohr gehabt zu haben, Dr. Sven Lange und Dr. Frank Nüßler nicht nur für ihren mir so sympathischen Humor und ihre angenehme Wesensart, Britta Schroth-Diez, Bolormaa Baljinyam, Sabine Schiller und Daniel Wüstner nicht nur für manche wertvolle Unterhaltung - sondern vor allem dafür, daß sie und all die anderen Mitglieder der Arbeitsgruppe Anlaß gaben, gern und mit Freude ins Labor zu kommen.

Nicht zuletzt möchte ich der ganzen Familie und besonders Dani für die Geduld und die Unterstützung danken.

Lebenslauf

Name: Ludwig
 Vorname: Kai
 Geburtsdatum: 26. März 1966
 Geburtsort: Zittau
 Familienstand: ledig, 1 Sohn (8 Monate)

Werdegang:

- | | | |
|-------------------|---|--|
| 9/1972 - 8/1980 | - | Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule |
| 9/1980 - 8/1984 | - | Erweiterte Oberschule, Abitur |
| 11/1984 - 10/1987 | - | Wehrdienst als Flugzeugtechniker |
| 11/1987 - 6/1992 | - | Studium der BIOPHYSIK am Fachbereich Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin, Diplomarbeit zum Thema: "Die Lag-Phase der Fusion von Influenza-Viren mit ihrer Targetmembran: Einfluß der Glykokalyx der Targetmembran und physiko-chemischer Faktoren (Ionenstärke) auf die Lag-Phase" |
| 7/1992 - 12/1992 | - | Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter im "Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei Berlin" im Rahmen des Projektes "Wirkung von Altarmen" zur möglichen Verbesserung der Wasserqualität der Spree (Projektleiter Dr. P. Kozerski) |
| 1/1993-12/1999 | - | Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Humboldt-Universität zu Berlin in der Gruppe "Molekulare Biophysik" bei Prof. Dr. A. Herrmann im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 312 "Gerichtete Membranprozesse". |
| 11/1995-12/1995 | - | Forschungsaufenthalt am "National Institut of Health", Bethesda, USA |
| 06/1997 | - | Informationsaufenthalt am "Laboratoire de Génétique des Virus, CNRS", Gif sur Yvette, Frankreich |

Veröffentlichungen

- Böttcher, C., Ludwig, K., Herrmann, A., van Heel, M., Stark, H. (1999) Structure of influenza haemagglutinin at neutral and at fusogenic pH by electron cryo-microscopy. *FEBS Lett.* 463(3), 255-259
- Korte, T., Ludwig, K., Booy, F.P., Blumenthal, R., Herrmann, A. (1999) Conformational Intermediates and Fusion Activity of Influenza Hemagglutinin. *J. Virol.* 73, 4567-4574
- Korte, T., Ludwig, K., Krumbiegel, M., Zirwer, D., Damaschun, G., Herrmann, A. (1997) Transient changes of the conformation of hemagglutinin of influenza virus at low pH detected by time-resolved circular dichroism spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 272, 9764-9770
- Ludwig, K., Stark, H., Böttcher, C., van Heel, M., Herrmann, A. (1996) Determination of three-dimensional structure of hemagglutinin of influenza A/Japan by image reconstruction from electron micrographs. (Poster)
Meeting 'Mechanisms of Biological Membrane Fusion', Noordwijkerhout, NL
- Müller, T., Fiedler, S., Schnell, Th., Ludwig, K., Jung, H. Fuhr, G. (1996) High frequency electric fields for trapping of viruses. *Biotechnology Techniques*, 10, 221-226
- Stark, H., Böttcher, C., Ludwig, K., Van Heel, M., Herrmann, A. (1996) 3D-electron microscopy of the viral fusion protein haemagglutinin.
Proceedings of the 11th congress on electron microscopy 26th-30th of August 1996, Dublin.
- Schnelle, Th., Müller, T., Fiedler, S., Shirley, S.G., Ludwig, K., Herrmann, A., Wagner, B., Zimmermann, U., Fuhr, G. (1996) Trapping of viruses in high frequency electric field cages. *Naturwissenschaften* 83(4), 172-176.
- Ludwig K, Korte T, Herrmann A (1995) Analysis of delay times of hemagglutinin-mediated fusion between influenza virus and cell membranes. *Eur. Biophys. J.* 24(2):55-64
- Ludwig K, Korte T, Herrmann A (1994) Influence of ionic strength on fusion of influenza virus. (Poster)
FEBS Special Meeting, Helsinki
- Korte T, Ludwig K, Herrmann A. (1992) ph-dependent hydrophobicity profile of hemagglutinin of influenza virus and its possible relevance in virus fusion. *Biosci. Rep.* 12, 397-406.

Erklärung

Ich erkläre, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, den 28. Februar 2000